

# **Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

An der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von

Anna Felicitas Schweinberger

geb. am 6. April 1988 in Erlangen

Angefertigt an der

Medizinischen Klinik 1, Pneumologie

Universität Leipzig

Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz

Betreuer: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz

Dr. rer. nat. Hartmut Kuhn

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

28.02.2017

## Bibliographische Beschreibung

Schweinberger, Anna

### Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte

Universität Leipzig, Dissertation

102 S., 164 Lit., 16 Abb., 5 Tab.

#### Referat:

Beatmungsbedingte Lungenschäden in der Therapie des akuten Atemnotsyndroms (ARDS) sind aufgrund der inhomogenen Vorschädigung der Lunge praktisch unvermeidbar. Die unphysiologische mechanische Belastung der Lunge führt über Volutrauma, Atelektotrauma und Biotrauma nicht selten zur Exazerbation des Syndroms und trägt zur hohen Mortalität des ARDS bei. Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Diesbezüglich vielversprechend ist die zentrale Komponente des Kinin-Kallikrein-Systems, namentlich Bradykinin, das über seinen B<sub>2</sub>-Rezeptor anti-apoptotische Signalwege aktivieren kann und somit zellprotektive Wirkung besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welcher Weise zyklische mechanische Dehnung die Konzentration einzelner Komponenten des Kinin-Kallikrein-Systems in isolierten alveolären Epithelzellen (Typ II) der Ratte beeinflusst. Dafür wurden die alveolären Typ-II-Zellen auf speziellen BioFlex®-Membranen kultiviert und für 24 Stunden zyklisch mit hoher Dehnungsamplitude gedehnt. Anschließend wurden mit etablierten Analysemethoden in Zellüberständen bzw. Zellysaten die Konzentrationen von Kininogen 1, Bradykinin und vom B<sub>2</sub>-Rezeptor gemessen, sowie die Aktivität des Enzyms Kallikrein und des Bradykinin-Abbaus bestimmt - jeweils im Vergleich mit Überständen bzw. Lysaten ungedehnter AT-II-Zellkulturen. Es zeigte sich dehnungsbedingt eine Zunahme der Bradykinin-Produktion durch Kininogen und Kallikrein und eine stark gesteigerte Bradykinin-abbauende Aktivität, sodass sich der Bradykininspiegel insgesamt verringerte. Die Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors blieb unverändert. Detailliertes Wissen über den Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf die Einzelkomponenten des Kinin-Kallikrein-Systems ist eine Grundvoraussetzung, um die zellprotektive Wirkung von Bradykinin im Sinne einer pharmakologischen Interventionsmöglichkeit bei ARDS nutzbar machen zu können.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	6
1.1. Zyklische Dehnung der Lunge als physiologischer Stimulus .....	6
1.2. Zyklische Dehnung der Lunge als pathologischer Stimulus .....	7
1.2.1. Beatmungsbedingte Lungenschäden .....	8
1.2.1.1. Pathomechanismen.....	8
A) Barotrauma und Volutrauma .....	8
B) Atelektotrauma .....	9
C) Biotrauma und Mechanotransduktion.....	10
D) Sauerstofftrauma .....	10
1.2.2. Das akute Atemnotsyndrom (ARDS) .....	11
1.2.2.1. Definition/Diagnosekriterien des ARDS .....	11
1.2.2.2. Ätiologie und Inzidenz des ARDS.....	12
1.2.2.3. Verlauf des ARDS.....	12
1.2.2.4. Therapie des ARDS .....	14
1.3. Das Kinin-Kallikrein-System des Menschen .....	16
1.3.1. Komponenten.....	17
A) Kallikrein.....	17
B) Kininogen.....	18
C) Bradykinin.....	18
D) Bradykinin-Rezeptoren.....	19
1.4. Das Kinin-Kallikrein-System der Ratte.....	21
2. Fragestellungen und Ziele der Studie.....	22
3. Material und Methoden.....	24

3.1.	Materialien .....	24
	Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien .....	24
	Tabelle 2: Lösungen, Puffer und Kulturmedien .....	26
	Tabelle 3: Assays .....	27
	Tabelle 4: Geräte und Arbeitsmittel .....	28
	Tabelle 5: Computer-Software .....	30
3.2.	Methoden .....	30
3.2.1.	Zellkultur .....	30
3.2.1.1.	Isolierung der AT-II-Zellen aus der Ratte .....	30
3.2.1.2.	Kultivierung der AT-II-Zellen .....	32
3.2.2.	Dehnungsexperiment .....	33
3.2.3.	Gewinnung von Analysematerial .....	35
3.2.4.	Auswertung der Experimente .....	36
3.2.4.1.	Bestimmung des Proteingehaltes .....	36
3.2.4.2.	Bestimmung der Kininogen-Konzentration .....	37
3.2.4.3.	Bestimmung der Kallikrein-Aktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie .....	38
3.2.4.4.	Bestimmung der Bradykinin-Konzentration .....	39
3.2.4.5.	Bestimmung der Bradykinin-abbauenden Aktivität .....	41
3.2.4.6.	Konzentrationsbestimmung des Bradykinin-Rezeptors 2 .....	43
3.2.5.	Statistik .....	44
4.	Ergebnisse .....	45
4.1.	Beeinflussung des Kinin-Kallikrein-Systems .....	45
4.1.1.	Kininogen .....	45
4.1.2.	Kallikrein .....	47
4.1.3.	Bradykinin-Konzentration .....	49
4.1.4.	Bradykinin-Abbau .....	50

4.1.5.	Bradykinin-Rezeptor 2 .....	53
4.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	54
5.	Diskussion .....	55
5.1.	Diskussion der Methoden .....	55
5.1.1.	Dehnexperiment .....	55
5.1.2.	Zellkultur .....	58
5.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	58
5.2.1.	Die Beeinflussung der Bradykinin-Konzentration durch zyklische mechanische Dehnung .....	58
5.2.2.	Die Beeinflussung der Bradykinin-bildenden Komponenten durch zyklische mechanische Dehnung .....	60
5.2.3.	Die Beeinflussung des Bradykinin-Abbaus durch zyklische mechanische Dehnung .....	64
5.2.4.	Die Beeinflussung des Bradykinin-Rezeptors 2 durch zyklische mechanische Dehnung .....	68
5.2.5.	Bedeutung der dehnungsinduzierten Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems. ....	71
5.3.	Schlussbetrachtungen und Ausblick .....	74
6.	Zusammenfassung .....	77
7.	Literaturverzeichnis .....	80
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	95
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	97
10.	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	100
11.	Curriculum vitae .....	101
12.	Danksagung .....	102

# 1. Einleitung

## 1.1. Zyklische Dehnung der Lunge als physiologischer Stimulus

Die Lunge ist ein dynamisches Organ, denn beginnend mit der fetalen Entwicklung bis zu unserem Lebensende ist sie stets unterschiedlichen physikalischen Kräften ausgesetzt: Dehnung und Entspannung während der Ein- und Ausatmung, Druckbelastung durch den Luftstrom in den Atemwegen und durch das pulsierende Herz, Oberflächenspannung und Scherstress. In physiologischem Maße sind diese Stimuli für die Entwicklung und Ausreifung der Lunge sowie die Regulation ihrer Funktionen von großer Bedeutung. Die fetale Lunge beispielsweise wird durch die aktive Sekretion von Flüssigkeit offen gehalten und mechanisch gedehnt. Ebenfalls dehnend wirken intermittierende Atembewegungen, die der Fetus im dritten Trimenon vollzieht. Durch diese mechanischen Reize werden das Lungenwachstum, die Differenzierung der alveolären Epithelzellen und die Ausdünnung der Alveolarsepten angeregt (Sanchez-Esteban et al. 2002; Scavo et al. 1998; Wirtz und Dobbs 2000; Sanchez-Esteban et al. 2001). So ergaben Untersuchungen zur alveolarepithelialen Differenzierung an explantierten fetalen Rattenlungen, dass zyklische Dehnung das Verhältnis zwischen Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten zugunsten des Typs I verschiebt, welcher die Blut-Gas-Schranke bildet (Gutierrez et al. 1999). Und in Reaktion auf intermittierende Dehnung - den Atemübungen in utero entsprechend - entdeckten Sanchez-Esteban et al. (2001) in isolierten fetalen Rattenlungenzellen eine erhöhte Expression von Surfactant-Protein-RNA, die für die postnatale Entfaltung und Offenhaltung der Lunge essentiell ist. Aber nicht nur der fetale, auch der adulte Surfactantmetabolismus unterliegt unter anderem der Regulation durch mechanische Kräfte: Intermittierende tiefe Atemzüge in vivo bzw. eine einzige Dehnung von isolierten Typ-II-Zellen *in vitro* stimulieren unmittelbar die Surfactantsekretion alveolärer Typ-II-Zellen über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und darauf folgender Exozytose (Arold et al. 2009; Wirtz und Dobbs 1990; Wirtz und Dobbs 2000).

Mechanische Reize können sogar in adulten Lungen Wachstum induzieren. Zahlreiche Studien seit den 1970er Jahren beschäftigen sich mit dem nach Pneumektomie beobachteten kompensatorischen Lungenwachstum (Berger und Burri 1985; Brody et al. 1978). Mechanische Stimuli werden dabei als die entscheidende Voraussetzung bei der

Wiederherstellung funktionsfähiger Gewebseinheiten angesehen, während hormonelle Wachstumsfaktoren und alveoläre Hypoxie zwar synergistisch wirken, aber für sich allein nicht in der Lage wären, das Remodelling oder gar die Ausbildung neuer alveolärer Einheiten einzuleiten (Hsia, Connie C W 2004).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mechanische Dehnung in physiologischem Maße die Prämisse für eine regelrechte Entwicklung, Funktion und gegebenenfalls auch für eine Regeneration der Lunge darstellt.

## **1.2. Zyklische Dehnung der Lunge als pathologischer Stimulus**

Im Gegensatz zur dargestellten physiologischen Dehnung der Lunge, kann sich zyklisch auftretende Kraft in der Lunge auch schädigend auswirken. Zum Beispiel kommt es bei obstruktiven Lungenerkrankungen, wie Asthma oder COPD, durch Air Trapping zu einer Überblähung bzw. Überdehnung der Alveolen. Bei restriktiven Erkrankungen, wie der Lungenfibrose, bilden sich durch die krankheitsbedingte Inhomogenität der Lungenstruktur Traktionskräfte zwischen belüfteten und unbelüfteten Arealen aus, die sich ebenfalls ungünstig auf die Lunge auswirken.

Dehnung spielt aber nicht nur in der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen eine Rolle, sondern kann ebenfalls akute Traumata aggravieren bzw. selbst hervorrufen. Das ARDS (*engl.* acute respiratory distress syndrome = akutes Atemnotsyndrom) stellt ein solches akutes Lungentrauma dar. Die maschinelle Beatmung als Therapiemaßnahme dieser Ateminsuffizienz kann zu weiterer lokaler und auch systemischer Schädigung führen.

Im Folgenden möchte ich mich näher mit der akuten Lungenschädigung und mit den durch Dehnung ausgelösten Pathomechanismen auseinandersetzen.

### 1.2.1. Beatmungsbedingte Lungenschäden

Die Beatmung kritisch kranker oder zu operierender Patienten gehört in der Intensivmedizin und Anästhesiologie zu den alltäglichen Basismaßnahmen. Dabei kann es zu einer Reihe von Komplikationen kommen, wie zum beatmungsassoziierten bzw. -induzierten Lungenschaden (VALI = **V**entilator-**A**ssociated **L**ung **I**njury bzw. VILI = **V**entilator **I**nduced **L**ung **I**njury). Die beiden Krankheitsbilder unterscheiden sich lediglich durch die Ausgangssituationen: VILI entsteht durch die Beatmung einer gesunden Lunge und steht oft in Zusammenhang mit experimentellen Studien (Prost et al. 2011), während VALI im klinischen Sprachgebrauch verwendet wird, da der Term einen Lungenschaden beschreibt, der sich durch die Beatmung einer bereits vorgeschädigten Lunge, wie beim ARDS, verschlechtert (Oeckler und Hubmayr 2007).

#### 1.2.1.1. *Pathomechanismen*

Durch maschinelle Beatmung werden Patienten unphysiologischen Atemmustern ausgesetzt, die über verschiedene Pathomechanismen zu Lungenschäden führen können. In tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass diese beatmungsbedingten Schäden klinisch und pathologisch denen einer akuten Lungenschädigung (ARDS) gleichzusetzen sind (Dreyfuss und Saumon 1998). Die zugrunde liegenden Pathomechanismen werden im Folgenden beschrieben:

#### **A) Barotrauma und Volutrauma**

Das Barotrauma wurde erstmals schon 1744 durch Fothergill als Ursache von Beatmungsschäden identifiziert. Es beschreibt Lungenschäden, die durch unphysiologisch hohe Beatmungsdrücke entstehen. Das krankheitsbedingt geschwächte pulmonale Gewebe kann dem hohen Druck nicht standhalten, sodass die Alveolarwände reißen und Luft in umliegendes Gewebe austritt. Diese druckinduzierte extraalveoläre Luftakkumulation wird nach ihrem Erstbeschreiber als Macklin-Effekt bezeichnet (Wintermark et al. 1999). Klinisch und radiologisch evidente Folgen sind Pneumomediastinum, Pneumoperitoneum, subkutanes Emphysem und (Spannungs-)Pneumothorax (The ARDS Network 2000).

1988 veröffentlichten Dreyfuss et al. eine bahnbrechende Studie, die das Barotrauma in den Hintergrund der VILI-Pathogenese rücken ließ und den Begriff des Volutraumas populär



machte. Im Experiment wiesen nämlich gesunde Ratten, die mit extrem hohem Druck und moderatem Tidalvolumen beatmet worden waren, keine signifikanten Lungenschäden auf, während diese bei Versuchstieren nach Beatmung mit moderatem Druck und hohem Tidalvolumen dramatische Ausmaße annahmen: Es kam zu Permeabilitätsstörungen der Kapillaren, Lungenödem und diffusem Alveolarschaden (Dreyfuss et al. 1988). Andere Studien an vorgeschädigten Lungen zeigten nach Beatmung mit hohem Tidalvolumen eine Aggravation des pulmonalen Ödems (Bowton und Kong 1989; Corbridge et al. 1990). Diese Erkenntnisse führen zu dem heute etablierten Pathogenesekonzept, dass weniger der endexpiratorische Atemwegsdruck, also das Barotrauma, sondern mechanische Dehnungskräfte, die in der Lunge durch Überblähung zustande kommen, für die Schädigung der Blut-Gas-Barriere verantwortlich sind (Kuchnicka und Maciejewski 2013; Slutsky 2005; Tremblay und Slutsky 1998).

## **B) Atelektotrauma**

Auch bei Beatmung mit niedrigem Tidalvolumen kann es zur Lungenschädigung kommen, dem sogenannten Atelektotrauma. Der schädigende Mechanismus sind hierbei Scherkräfte, die zwischen belüfteten und unbelüfteten, das heißt zwischen durch Ödem und Surfactantdysfunktion atelektatischen Bereichen auftreten. Durch das atemzyklische Entfalten und Kollabieren dieser instabil gewordenen Abschnitte (engl. recruitment and derecruitment) vergrößert sich der Scherstress, der multidirektional entlang des bindegewebigen Synzytiums auf die angrenzenden Lungenbereiche wirkt (Kuchnicka und Maciejewski 2013; Bilek et al. 2003). Zusätzlich verkleinert sich durch nicht mehr rekrutierbare Atelektasen das ventilierbare Lungenvolumen, wodurch es selbst bei scheinbar niedrigem Tidalvolumen zur Überblähung der Alveolen im verbleibenden Restabschnitt kommen kann. Dieser sogenannte *baby lung effect* potenziert die Lungenschädigung durch Volutrauma (Gattinoni und Pesenti 2005). Verschiedene Studien zeigen, dass diesen Schädigungsmechanismen durch den Einsatz von positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) entgegengewirkt werden kann. Dieser verhindert Atelektasenentstehung bzw. unterstützt deren Rekrutierung und verbessert somit die Oxygenierung (Muscedere et al. 1994; Ricard et al. 2003; Argiras et al. 1987).

### **C) Biotrauma und Mechanotransduktion**

Während Baro- und Volutrauma direkt anatomische Lungenstrukturen schädigen, handelt es sich beim Biotrauma um indirekte Wirkungen mechanischer Reize. Der Begriff Biotrauma wurde 1998 von Tremblay und Slutsky geprägt und meint biochemische Schädigung durch Mediatorenfreisetzung. Mechanotransduktion bezeichnet den Mechanismus, durch den das Biotrauma entsteht, nämlich die Konversion des physikalischen Reizes der Zellmembrandehnung in die Aktivierung intrazellulärer Regulationsmechanismen (Wang et al. 1993). Wie zahlreiche Studien belegen, veranlassen die während der Beatmung wirkenden Kräfte bei intakter anatomischer Lungenstruktur die Produktion und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie Leukozytenrekutierung aus dem Gefäßbett und fördern den lokalen Entzündungsprozess (Pugin 2003; Uhlig 2002). Wichtige involvierte Entzündungsmediatoren sind TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10, die von pulmonalen Epithel- und Endothelzellen produziert werden (Halbertsma et al. 2005). Ihre pro-inflammatorische Wirkung beschränkt sich dabei nicht nur auf die Lunge, sondern breitet sich systemisch aus. Diese Dekompartimentalisierung ruft eine systemische inflammatorische Immunantwort (SIRS) hervor und führt in vielen Fällen zum Tod durch Multiorganversagen (Slutsky und Tremblay 1998).

Durch Mechanotransduktion kann ebenfalls der feinregulierte Vorgang der Apoptose beeinflusst werden. Bardales et al. (1996) zeigten, dass ein Großteil der alveolären Typ-II-Zellen, die bei der akuten Lungenschädigung zugrunde gehen, durch Apoptose kontrolliert absterben, das heißt ohne begleitende Entzündungsreaktion. Diese Steigerung der Apoptose ist dehnungsinduziert und beruht vermutlich auf der Hemmung anti-apoptotisch wirkender Signalwege durch Mechanotransduktion (Hammerschmidt et al. 2004). Einer dieser Signalwege ist der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)/Akt-Signalweg, der unter anderem durch Bradykinin aktiviert wird (Hammerschmidt et al. 2007).

### **D) Sauerstofftrauma**

Die Beatmung mit einer hohen inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $F_{iO_2}$ ) begünstigt die Bildung von Resorptionsatelektasen, da die physiologischerweise in der Atemluft vorhandene Stickstofffraktion von 78% vermindert ist bzw. bei  $F_{iO_2} = 100\%$  gänzlich fehlt.

Stickstoff verbleibt normalerweise nach Diffusion des Sauerstoffs in den Alveolen und hält sie dadurch offen. Entfällt dieser Effekt, kommt es zum Alveolenkollaps, dann auch genannt Resorptionsatelektase (Habre und Peták 2014). Des Weiteren bilden sich bei einer hohen inspiratorischen Sauerstofffraktion reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. **Reactive Oxygen Species**), die über die Aktivierung verschiedener Proteine, zum Beispiel der Caspase 3, den programmierten Zelltod einleiten und so zur Lungenschädigung durch toxisches Sauerstofftrauma beitragen (Tanaka et al. 2012; Wang et al. 2007). Aus diesen Gründen gilt es die  $F_{iO_2}$  so gering wie möglich zu halten, das heißt sie eben so hoch zu wählen, dass noch eine ausreichende Sauerstoffsättigung (ca. 90%) gewährleistet ist (Whitehead und Slutsky 2002).

## 1.2.2. Das akute Atemnotsyndrom (ARDS)

### 1.2.2.1. Definition/Diagnosekriterien des ARDS

Das ARDS ist durch entzündliche Prozesse in der Lunge gekennzeichnet, die eine Störung des Gasaustausches in einer zuvor gesunden Lunge verursachen. Obwohl das Syndrom bereits im Jahre 1967 von Ashbaugh et al. erstmals beschrieben wurde, konnte man sich erst über 25 Jahre später auf eine einheitliche Definition mit festgelegten Diagnosekriterien einigen. Die 1994 von der AECC (American-European Consensus Conference) veröffentlichten Kriterien (Bernard et al. 1994) wurden in der sogenannten „Berlin-Definition“ von 2012 nochmals überarbeitet (Ranieri et al. 2012). Diese aktuell gültige Definition beschreibt das Syndrom wie folgt:

- Akutes Auftreten innerhalb einer Woche bzw. neue oder sich verschlechternde respiratorische Symptome
- Bilaterale Lungeninfiltrate in Computertomographie oder Röntgenbild
- Die auftretende Ateminsuffizienz ist nicht zu erklären durch Herzinsuffizienz, Volumenüberschuss oder alternative Ursachen.
- Hypoxämie, definiert durch den Horowitz-Quotienten aus arteriellem Sauerstoff-Partialdruck und der Inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $P_aO_2/F_{iO_2}$ ). Der Quotient

muss bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O erhoben werden:

- Mildes ARDS bei einem Quotienten zwischen 300 und 200
- Moderates ARDS bei einem Quotienten zwischen 200 und 100
- Schweres ARDS bei einem Quotienten unter 100

Die neue Einteilung nach Schweregraden macht die frühere Unterteilung in ARDS und ALI (*engl.* acute lung injury) obsolet, sodass der Term ALI entfällt, der früher für Patienten mit einem Horowitz-Quotienten zwischen 200 und 300 angewandt wurde.

#### *1.2.2.2. Ätiologie und Inzidenz des ARDS*

Die Ursachen dieser plötzlich auftretenden Entzündung können in direkte und indirekte eingeteilt werden. Zu den direkten, das heißt Ursachen pulmonalen Ursprungs, gehören Pneumonie, Aspiration, Inhalationstrauma, Beinahe-Ertrinken, Fettembolie, Lungenkontusion und Perfusionstrauma. Zu den indirekten, extrapulmonal liegenden Ursachen werden Sepsis, Polytrauma, Schock, akute Pankreatitis, disseminierte intravasale Gerinnung, Verbrennungen, Kopfverletzungen und die transfusionsassoziierte Lungenschädigung (TRALI) gezählt (Frutos-Vivar et al. 2006). Pneumonie und Sepsis gelten bei Weitem als die häufigsten Ursachen (Villar et al. 2011). Die Inzidenz der Erkrankung liegt laut der prospektiven spanischen ALIEN-Studie bei 7,2/100.000 pro Jahr. Das Ergebnis stimmt mit anderen retrospektiven Studien bezüglich der Inzidenz in Europa überein (Villar et al. 2011). Es bleibt zu erwähnen, dass diese Datenerhebungen auf den Diagnosekriterien laut AECC beruhen und somit Patienten mit mildem ARDS (früher ALI) nicht einschließt.

#### *1.2.2.3. Verlauf des ARDS*

Das ARDS verläuft in drei Abschnitten, der exsudativen, der proliferativen und der fibrotischen Phase.

Ware und Matthay (2000) beschreiben die exsudative Frühphase folgendermaßen: Durch Schädigung des alveolären Epithels und/oder des mikrovaskulären Endothels kommt es zu

einem diffusen Alveolarschaden mit einer erhöhten Kapillarpermeabilität. Dadurch kann proteinreiche Flüssigkeit zunächst ins Interstitium und dann in die Alveolen übertreten. Das Ödem zeichnet sich durch eine hohe Konzentration an Zytokinen und anderen pro-inflammatorischen Mediatorstoffen aus, die die Migration von Immunzellen und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bewirken. Die entzündungsbedingte Schwellung des kapillaren Endothels und des Interstitiums sowie die Ausbildung hyaliner Membranen aus Zelltrümmern, Plasmaproteinen und Surfactant entlang der alveolären Basalmembran verlängert die Diffusionsstrecke der Blut-Gas-Schranke, was den Gasaustausch in erheblichem Maße reduziert. Durch die Beeinträchtigung und Reduktion der epithelialen Typ-II-Zellen werden zusätzlich der Flüssigkeitsrücktransport aus den Alveolen und die Surfactantproduktion gestört, wodurch sich das Ödem weiter verschlechtert und Atelektasenbildung durch verringerte pulmonale Compliance begünstigt wird. Bei Verlust der Barrierefunktion des alveolären Epithels droht außerdem der Übertritt pulmonaler Bakterien in den systemischen Kreislauf; ein septischer Schock wäre die Folge.

Nach etwa sieben bis zehn Tagen beginnt die proliferative Phase, in der der reparative Prozess beginnt: Das alveoläre Epithel regeneriert sich durch proliferierende und sich differenzierende Pneumozyten. Die Resorption des alveolären Ödems findet aktiv durch Typ-II-Zellen und passiv durch Aquaporine auf der Oberfläche von Typ-I-Zellen statt. Zelltrümmer und Proteinreste werden durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten beseitigt (Ware und Matthay 2000). Die endotheliale Heilung ist weniger gut entschlüsselt; vermutlich wird sie kombiniert durch endotheliale Zellmigration und -proliferation vollzogen. Zirkulierenden Progenitorzellen konnte eine Beteiligung am endothelialen Heilungsprozess nachgewiesen werden (Rafii und Lyden 2003; Xu 2007), erhöhte Konzentrationen dieser Progenitorzellen bei ARDS wurden mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht (Burnham et al. 2005).

Bei einigen Patienten kommt es allerdings anstelle der alveolären Regeneration zum Übertritt in die fibrotische Phase, die durch vermehrtes fibrotisches Remodelling gekennzeichnet ist (Castro 2006): Proliferierende Fibroblasten und Myofibroblasten wandern in die hyalinen Membranen ein und bilden Granulationsgewebe. Alveoläre Typ-II-Zellen migrieren entlang des Granulationsgewebes und verwandeln das intraalveoläre Exsudat in interstitielles Gewebe, was zu verdickten Alveolarsepten führt. Atelektatische

Bereiche werden ebenfalls fibrotisch umgebaut. Dadurch wird die Gasaustauschfläche irreversibel vermindert und die Prognose der Patienten verschlechtert (Castro 2006). Obwohl die fibrotische Alveolitis erst spät im Krankheitsverlauf des ARDS evident wird, gibt es Hinweise darauf, dass der fibrosierende Verlauf bereits in den ersten Erkrankungstagen durch pro-inflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1 und erhöhte Konzentrationen von Prokollagen III in Gang gesetzt wird (Ware 2006).

#### 1.2.2.4. Therapie des ARDS

Im Vordergrund der symptomorientierten Therapie steht die Behandlung der respiratorischen Insuffizienz mittels lungenprotektiver Beatmung (The ARDS Network 2000). Aufgrund der diffusen inhomogenen Schädigung der Lunge stellt die Wahl adäquater Beatmungsparameter eine besondere Herausforderung dar: flüssigkeitsgefüllte, kollabierte, überblähte und noch gesunde Areale existieren in der ARDS-Lunge nebeneinander und prädestinieren geradezu für weitere Schädigungen im Sinne einer VALI/VILI. Die ARDS-Network-Studie von 2000 zeigt, dass die lungenprotektive Beatmung mit einem niedrigen Tidalvolumen von 6 ml/kg errechnetem Körpergewicht der traditionellen Beatmung mit einem Tidalvolumen von 12 ml/kg weit überlegen ist. Um Atelektasen zu vermeiden und bestmöglich zu rekrutieren, sollte nach der *open lung ventilation* mit PEEP-Werten beatmet werden, die optimalerweise 2 cmH<sub>2</sub>O oberhalb des unteren Wendepunktes der Druck-Volumen-Kurve liegen oder bei unbekannter Kurve bei circa 16 cmH<sub>2</sub>O (Villar et al. 2006). Eine weitere Verbesserung der Oxygenierung kann durch medikamentöse neuromuskuläre Blockade und durch Bauchlagerung des Patienten erreicht werden (Papazian et al. 2010; Guérin et al. 2013).

Wie bei allen kritisch kranken Patienten liegt auch beim ARDS-Patienten ein Fokus auf der supportiven Therapie: adäquate enterale Ernährung (Gerlach und Murphy 2011) und die Prävention weiterer Komplikationen wie nosokomialer Infektionen, gastrointestinaler Blutungen und thromboembolischer Ereignisse sind entscheidend für den Therapieverlauf.

Andere nicht-ventilatorische Therapieansätze waren bisher nicht von Erfolg gekrönt. Weder Ansätze, die auf eine verbesserte Lungenmechanik abzielten, wie die Instillation von Surfactant und die Inhalation von NO (Anzueto et al. 1996; Afshari et al. 2010; Anzueto et al.

1996) noch anti-inflammatorische Therapieansätze mit aktiviertem Protein C, GM-CSF (*engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor*), Kortikosteroiden, Neutrophilen Elastase-Inhibitoren, Statinen oder Omega-3-Fettsäuren führten zu einem Rückgang der Mortalität bei ARDS (Anzueto et al. 1996; Christiaans et al. 2013; Paine et al. 2012; Peter et al. 2008; Iwata et al. 2010; Truwit et al. 2014; Rice et al. 2011).

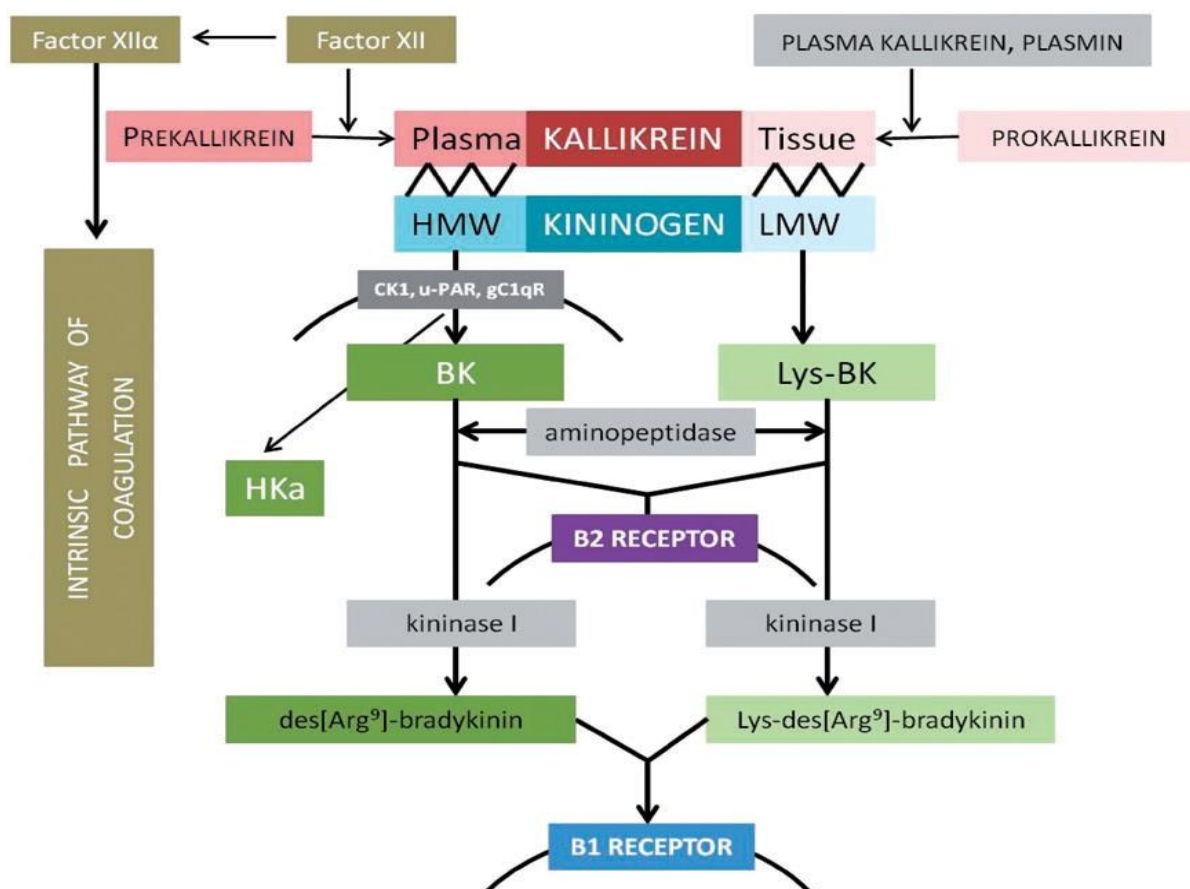
Trotz der beträchtlichen pathogenetischen und beatmungstherapeutischen Fortschritte in den letzten zehn Jahren ist die Mortalität bei ARDS mit über 40% nahezu unverändert hoch geblieben (Wang et al. 2014; Villar et al. 2011). Die Notwendigkeit neuer pharmakologischer Behandlungen ist evident - potentielle Therapien befinden sich derzeit noch in der Testphase. Zu den möglichen Angriffspunkten gehören das Ubiquitin-Proteasom-System, die Modifikation von Signalwegen der sterilen Inflammation, die Förderung der Epithelregeneration mittels Keratinozyten-Wachstumsfaktor und stammzellenbasierter Therapie sowie die Modulation der Zellantwort durch ACE-Inhibitoren oder Agonismus an Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (Han und Mallampalli 2015; Shyamsundar et al. 2014).

Mit dem Therapieansatz der ACE-Inhibitoren möchte ich mich näher beschäftigen: In einer Studie von Hammerschmidt et al. (2004) wurde am Modell der Ratte gezeigt, dass der ACE-Inhibitor Captopril die Steigerung der Apoptoserate alveolärer Typ-II-Zellen unter zyklischer mechanischer Dehnung fast gänzlich verhindern kann. ACE-Inhibitoren hemmen, wie der Name verrät, das Angiotensin-konvertierende Enzym und greifen so in das blutdruckregulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ein. Die Beteiligung des RAAS an der dehnungsinduzierten Apoptose der Typ-II-Zellen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden: Dehnung beeinflusst weder die Angiotensinexpression oder -produktion noch hat die Hemmung des RAAS am Angiotensin-II-Rezeptor eine protektive Wirkung (Hammerschmidt et al. 2007). ACE-Inhibitoren wirken aber noch auf eine andere Weise: Sie hemmen den Abbau von Bradykinin (BK), einem Peptidhormon, dem protektive und anti-apoptotische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Houle und Marceau 2003; Li und Sato 2001; Xie et al. 2000). Hammerschmidt et al. (2007) zeigten an isolierten Typ-II-Zellen der Ratte, dass zyklische mechanische Dehnung die Bradykinin-Konzentration senkt, ACE-Inhibitoren sie jedoch konstant halten können - vergleichbar zu Bradykinin-Konzentrationen ungedehnter Zellen. Dehnungsinduzierte Apoptose konnte sowohl durch

die Bradykinin-Konzentrationserhöhung bei gehemmtem Bradykinin-Abbau mittels ACE-Inhibitoren als auch durch direkt zugesetztes Bradykinin reduziert werden. Bradykinin ist die zentrale Komponente eines weitläufigen Proteinsystems, des Kinin-Kallikrein-Systems (KKS), das in der vorliegenden Arbeit genauer beleuchtet werden soll.

### 1.3. Das Kinin-Kallikrein-System des Menschen

Das Kinin-Kallikrein-System (KKS) ist eine Multi-Protein-Kaskade, die eine Schlüsselrolle spielt in Entzündungsgeschehen, Vasodilatation, Kontraktion glatter Muskulatur, kardiovaskulärer Prävention, Gefäßpermeabilität, Blutdruckkontrolle, Gerinnung und Schmerzentstehung (Bossi et al. 2011; Colman und Schmaier 1997; Colman 2006; Marcondes und Antunes 2005). Die Hauptaufgaben des KKS bestehen in der Regulation der plasmatischen Gerinnung und der Synthese von Bradykinin. Bradykinin (BK) ist ein Autakoid, das eine hohe Affinität zu den Bradykinin-Rezeptoren B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> aufweist und so komplexe intrazelluläre Signalwege beeinflusst (Kashuba et al. 2013).



**Abbildung 1: Kinin-Kallikrein-System:** Komponenten und deren Interaktionen (Kashuba et al. 2013).



### 1.3.1. Komponenten

#### A) Kallikrein

Bradykinin wird durch enzymatische Hydrolyse aus Kininogenen gewonnen. Die kinin-formenden Enzyme sind Serinproteasen und werden Kallikreine genannt. Kallikreine existieren in zwei Unterformen, dem Plasma-Kallikrein (p-Kallikrein), das als inaktives Prekallikrein im Plasma vorliegt und nach Aktivierung selektiv *high molecular weight* Kininogen (HMWK) hydrolysiert, und dem Gewebe-Kallikrein (t-Kallikrein für engl. *tissue*), das *low molecular weight* Kininogen (LMWK) und in Anteilen auch HMWK hydrolysiert (Kashuba et al. 2013). Die Synthese von Plasma-Prekallikrein findet vorrangig in Hepatozyten statt, konnte aber auch extrahepatisch in zahlreichen Organen nachgewiesen werden, einschließlich der Epithelzellen des Respirationstraktes, was zusätzlich auf gewebespezifische Funktionen des Enzyms schließen lässt (Fink et al. 2007). Plasma-Prekallikrein zirkuliert zum Großteil an HMWK gebunden (Colman 2006), wird zinkabhängig an Multiproteinrezeptor-Komplexe auf Endothelzellen gebunden und dort zu p-Kallikrein aktiviert (Rojkjaer und Schmaier 1999).

Prokallikrein, die inaktive Vorstufe von t-Kallikrein, wird in diversen Geweben produziert und ins lokale Milieu sezerniert, z.B. in Nieren, Pankreas, Hypophyse, Milz, Nebenniere, Erythrozyten und Neutrophilen (MacDonald et al. 1988; Marcondes und Antunes 2005). In einigen Geweben wird t-Kallikrein in besonders großer Menge produziert, dazu gehört unter anderem die Lunge (Kaplan et al. 2002).

Zusammenfassend liegt in der Lunge also hauptsächlich Gewebe-Kallikrein vor, aber auch Plasma-Kallikrein konnte nachgewiesen werden. Dies wiederum kommt der Aktivität des t-Kallikreins zugute, denn seine Vorstufe Prokallikrein wird in vivo durch Plasmin und p-Kallikrein aktiviert (Takada et al. 1985; Yamada und Erdos 1982).

## **B) Kininogen**

Kininogene sind große Proteine, die den Kallikrein-Serinproteasen als Substrate dienen, um Bradykinin und Lys-Bradykinin (Kallidin) freizusetzen. Im menschlichen Körper sind die schon erwähnten Formen HMWK und LMWK sowie HKa bekannt; letzteres ist der nach der Hydrolyse von Bradykinin verbleibende Proteinrest des HMWK (Colman 2006). Kininogene werden in Leber, Nieren, in der Lunge und verschiedenen anderen Geweben, zum Beispiel im Endothel synthetisiert (Chao et al. 1993; Schmaier et al. 1988). Eine Studie von Okamoto et al. (1996) zeigt, dass Kininogen-Synthese auch in humanen Fibroblasten stattfindet und durch Entzündungsmediatoren stimuliert werden kann. HMWK und LMWK werden auf demselben Gen kodiert und durch alternatives Splicing des Gentransskripts gewonnen (Takano et al. 2000). Neben ihrer Eigenschaft als Substrat sind Kininogene auch eigens biologisch aktiv: HMWK wirkt beispielsweise anti-thrombotisch (Hassan et al. 2007) und HKa anti-adhäsiv, wodurch die Endothelzellmigration und somit die Angiogenese unterdrückt wird (Colman et al. 2000).

## **C) Bradykinin**

Bradykinin (BK) ist ein Nonapeptid, dessen Aminosäuresequenz aus HMWK durch p-Kallikrein freigesetzt wird. Parallel dazu entsteht durch t-Kallikrein aus LMWK und anteilig aus HMWK im lokalen Milieu Lys-Bradykinin, auch Kallidin genannt; Lys-BK besitzt eine zusätzliche Aminosäure am N-Terminus, deren Entfernung durch Aminopeptidasen der Konversion zu BK entspricht (Kuoppala et al. 2000). BK und Lys-BK (Kallidin) sind beide spezifische Agonisten am Bradykinin-Rezeptor  $B_2$  (Kuhr et al. 2010). Für ihre kurze Halbwertszeit mit unter 30 Sekunden (Cyr et al. 2001) sind verschiedene abbauende Enzyme verantwortlich: die Kininase I (Carboxypeptidasen CPN im Plasma und CPM auf Zellmembranen), die Kininase II (auch bekannt als Angiotensin-konvertierendes Enzym ACE) und die Neutrale Endopeptidase NEP (Kashuba et al. 2013). Die Carboxypeptidasen metabolisieren Bradykinin, indem sie Arginin vom Carboxylende entfernen. Dadurch entsteht des[Arg]-Bradykinin, dem die spezifische Bindungsstelle für den  $B_2$ -Rezeptor fehlt, das aber als spezifischer Agonist am  $B_1$ -Rezeptor aktiv ist (Couture et al. 2001). ACE und NEP inaktivieren Bradykinin, indem sie ein C-terminales Dipeptid entfernen (Nowak et al. 2011).

#### D) Bradykinin-Rezeptoren

Die Bradykinin-Rezeptoren gehören zu den transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Hess et al. 1992; Menke et al. 1994). Anhand ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften teilt man sie in zwei Subtypen ein, genannt B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> oder Bradykinin-Rezeptor 1 und 2 (Marceau et al. 1998). Der B<sub>2</sub>-Rezeptor ist ubiquitär und konstitutiv exprimiert. Er besitzt spezifische Bindungsstellen für BK und Lys-BK (Kallidin) und spielt eine entscheidende Rolle in der akuten Phase des Entzündungsgeschehens und der Schmerzantwort (Couture et al. 2001). Seine Wirkmechanismen sind für die schnelle und kurzfristige Signalübermittlung ausgelegt, da die Liganden schnell dissoziieren und bei andauernder Stimulation zügig die Desensibilisierung, Internalisierung und Down-Regulierung des Rezeptors erfolgt (Leeb-Lundberg et al. 2005).

Im Gegensatz dazu ist der B<sub>1</sub>-Rezeptor in gesundem Gewebe kaum nachweisbar, wird aber bei Entzündung induziert und überexprimiert (Siebeck et al. 1998). Bei Gewebeschädigung und Kontakt mit bakteriellen Endotoxinen und Zytokinen erfolgt die Aktivierung durch seine Liganden des[Arg]-Bradykinin und Lys-des[Arg]-Bradykinin (des[Arg]-Kallidin) (Couture et al. 2001). Einmal durch diese Bradykinin-Abbauprodukte aktiviert, ist der B<sub>1</sub>-Rezeptor resistent gegen Desensibilisierung und Internalisierung, weswegen er auch dem chronischen Entzündungsgeschehen zugeordnet wird, während der B<sub>2</sub>-Rezeptor in die akute inflammatorische Phase involviert ist (Leeb-Lundberg et al. 2005).

Da die vorliegende Arbeit die akuten Effekte zyklischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System untersucht, wird hier lediglich der Bradykinin-Rezeptor 2 näher betrachtet.

Der B<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt zahlreiche Effekte: Über eine Steigerung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure und Prostaglandin E<sub>2</sub>, die eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen spielen (Prado et al. 2002). Abbildung 2 zeigt weitere *downstream* gelegene Effekte: Über die Aktivierung von Phospholipase C und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) kommt es zu einer intrazellulären Kalzium-Erhöhung, durch die viele vaskuläre Vorgänge gesteuert werden, einschließlich der NO-Produktion. Die NO-Synthese durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird über mehrere Wege transient gesteigert: Einerseits über die bereits erwähnte intrazelluläre Kalzium-Konzentration und andererseits

über die ebenfalls B<sub>2</sub>-Rezeptor-gekoppelte Aktivierung des PI3K/Akt-Weges (Kuhr et al. 2010). Der PI3K/Akt-Signalweg ist eine wichtige Schaltstelle der Apoptoseregulation; seine Aktivierung wirkt sich auf verschiedene Weise anti-apoptotisch, also zellprotektiv aus: Beispielsweise seien genannt die Hemmung des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bad, die Phosphorylierung der Initiatorcaspase-9, die Aktivitätsminderung des MAP-Kinase-Signalweges und die Enthemmung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF-κB (Barthwal et al. 2003; Cardone et al. 1998; Datta et al. 1997; Kane et al. 1999).

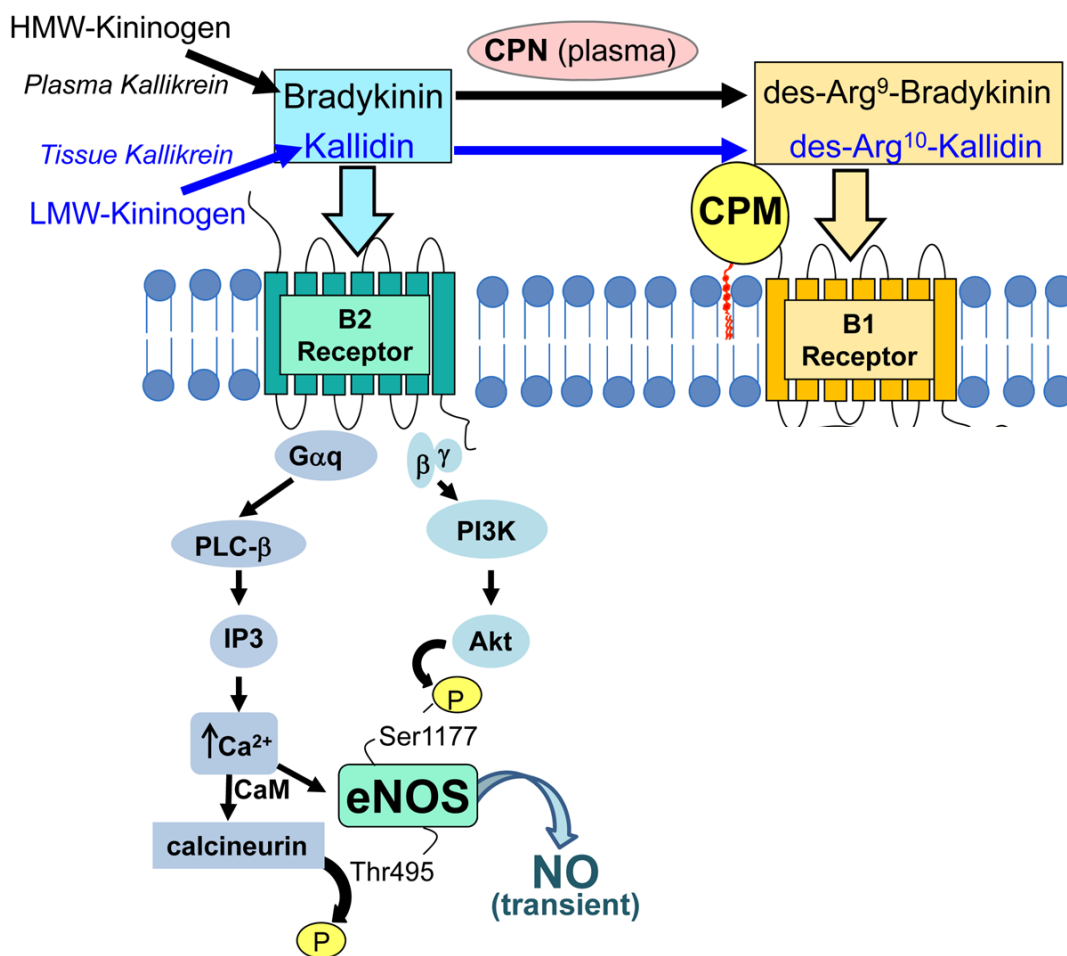


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung der Kinin-Agonisten am B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor und downstream Signalwege des B<sub>2</sub>-Rezeptors (Kuhr et al. 2010).

#### 1.4. Das Kinin-Kallikrein-System der Ratte

Das Kinin-Kallikrein-System der Ratte weist im Vergleich zu anderen Säugern einschließlich des Menschen einige einzigartige Unterschiede auf, die ich im Folgenden darlegen möchte.

Die Ratte besitzt zusätzlich zum HMWK und LMWK, die auch im Menschen vorkommen, zwei weitere Ratten-spezifische Kininogene, das T-Kininogen 1 und das T-Kininogen 2, aus denen T-Kinin entsteht (Okamoto und Greenbaum 1986). T-Kinine entstehen nicht durch Kallikreine, sondern konnten *in vitro* nur durch hohe Konzentrationen an Trypsin freigesetzt werden (Okamoto und Greenbaum 1983). Kallikrein wird zwar den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen zugeordnet, hat aber eine höhere Spezifität für bestimmte Spaltungsorte an Polypeptidsubstraten, die bei T-Kininogenen nicht vorliegen (MacDonald et al. 1988). Die T-Kininogen-Synthese findet vor allem in der Leber und auch in geringeren Mengen in der Lunge und den Nieren statt (Mann und Lingrel 1991). Ein dem T-Kinin der Ratte identisches Peptid konnte auch im menschlichen Organismus nachgewiesen werden: Es entspricht dem humanen Ile-Ser-Bradykinin, das als Permeabilitätsfaktor an der Entstehung von Aszites bei Ovarialkarzinom beteiligt ist (Wunderer et al. 1986).

Eine weitere wichtige Besonderheit bei der Ratte ist die Kininogen-Proteolyse, da sich LMWK und HMWK der Ratte N-terminal von humanen nieder- und hochmolekularen Kininogenen unterscheiden: Während beim Menschen vor der Bradykinin-Sequenz die Aminosäure Lysin steht, befindet sich dort bei der Ratte die Aminosäure Arginin. Daher kann in der Ratte kein Lys-Bradykinin (Kallidin) gebildet werden. Belegt durch mehrere Studien etablierte sich aus diesem Grund das Modell, dass in Ratten ausschließlich Bradykinin entsteht, das sowohl durch Plasma- als auch durch Gewebe-Kallikrein gebildet wird (Kato et al. 1985; Girolami et al. 1986). Im Widerspruch dazu gelang es Hilgenfeldt et al. im Jahre 2005 erstmals mithilfe eines spezifischen selektiven Antiserums ein zum humanen Lys-Bradykinin (Kallidin) analoges Peptid in der Ratte nachzuweisen: Das *Kallidin-like-Peptide* (KLP) mit der Aminosäure Arginin am N-Terminus, also Arg-Bradykinin im Vergleich zum humanen Lys-Bradykinin, das in der Ratte durch t-Kallikrein aus LMWK proteolysiert wird (Hilgenfeldt et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde Kininogen 1 der Ratte bestimmt. Kininogen 1 ist ein Kininogen-Vorläuferprotein, aus dem Bradykinin freigesetzt wird. Es enthält außer der Bradykininsequenz sowohl die leichte als auch die schwere Peptidkette, aus denen das LMWK und HMWK der Ratte zusammengesetzt sind (UniProt 2014).

## 2. Fragestellungen und Ziele der Studie

Die maschinelle Beatmung von Patienten mit respiratorischer Insuffizienz ist in der intensivmedizinischen Versorgung unverzichtbar. Neben der lebensrettenden Funktion hat die Beatmungstherapie leider auch negative Begleiterscheinungen. Über verschiedene Pathomechanismen kann es zur primären Schädigung der Lunge beziehungsweise zur Aggravation der bestehenden Lungenschäden kommen, dabei spricht man von VILI/VALI (*engl. ventilator induced/associated lung injury*). Durch die heterogene Vorschädigung beim akuten Atemnotsyndrom (ARDS) sind beatmungsbedingte Schäden im Sinne einer VALI vorprogrammiert, weswegen sich die erfolgreiche Therapie häufig schwierig gestaltet. Ursächlich ist dabei unter anderem die Überdehnung des alveolären Epithels, die zu Inflammation und Apoptose führt. Im *in vitro*-Experiment an alveolären Typ-II-Zellen der Ratte führte 24-stündige Überdehnung bei einem Drittel der Zellen zum kontrollierten Zelltod (Hammerschmidt et al. 2004).

Hammerschmidt et al. (2007) zeigten am *in vitro*-Rattenmodell, dass Bradykinin bei der dehnungsinduzierten Apoptose der alveolären Typ-II-Zellen über die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges eine protektive Wirkung entfaltet. (Über-)Dehnung alveolärer Typ-II-Zellen führte zur Abnahme der Bradykinin-Konzentration und folglich zur verminderten Aktivierung dieses protektiven Signalweges. Bradykinin-Substitution hingegen bewirkte in ihrem Dehnexperiment die dosis-abhängige Reduktion der Apoptoserate. Diese Erkenntnis eröffnet die Perspektive neuer pharmakologischer Möglichkeiten in der Prävention beatmungsbedingter Lungenschäden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Bradykinin-bildende Kinin-Kallikrein-System zu untersuchen. In einem etablierten experimentellen Aufbau wird an isolierten alveolären Typ-II-Zellen der Ratte *in vitro* über 24 Stunden die pathologische Beatmung mit hohem Tidalvolumen simuliert. Jeweils im Vergleich zur ungedehnten (statischen) Zellkultur wird dann das Verhalten der einzelnen Komponenten des Kinin-Kallikrein-Systems beleuchtet:

- Wie verändert sich die Proteinexpression von Bradykinin nach 24 Stunden Dehnungsstress? Kann das Ergebnis der dehnungsbedingten Konzentrationsabnahme (Hammerschmidt et al. 2007) bestätigt werden?
- Wie werden die Bradykinin-bildenden Komponenten beeinflusst, namentlich die Konzentration der Peptid-Vorstufe Kininogen und die Enzymaktivität der Serinprotease Kallikrein?
- Wird der Bradykinin-Abbau dehnungsinduziert beschleunigt oder verlangsamt?
- Wie verändert sich die Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors?

Dabei sollten folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Die Bradykinin-Konzentration sinkt, weil zyklische mechanische Dehnung die Bradykinin-Produktion durch Kininogen und Kallikrein beeinträchtigt.
2. Die Bradykinin-Konzentration sinkt, weil die Bradykinin-abbauende Aktivität durch zyklische mechanische Dehnung gesteigert wird.
3. Die Konzentration an freiem Bradykinin sinkt, weil zyklische mechanische Dehnung die B<sub>2</sub>-Rezeptordichte erhöht und Bradykinin dadurch vermehrt rezeptorgebunden vorliegt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

**Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Accutase®	BioLegend, San Diego, USA
Aqua dest.	Braun, Melsungen, D
β-Glycerophosphat	Merck, Darmstadt, D
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Sigma Aldrich, München, D
DDT (Dithiothreitol)	Merck, Darmstadt, D
DMEM (high Glucose)	GE Healthcare, Pasching, Austria
DMEM (low Glucose)	GE Healthcare, Pasching, Austria
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0,5M	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Merck, Darmstadt, D
Elastase (Schweinepankreas)	Elastin Products CO., Owensville, USA
Fibronectin	Roche Diagnostics, Mannheim, D
FKS (fetales Kälberserum)	PAA, Pasching, Austria
Gentamicin 10 mg/ml	Lonza, Verviers, Belgien
Glucose	Sigma Aldrich, München, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D



Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm, D
HEPES Buffer 1M	Lonza, Verviers, Belgien
Isopropanol 70% Vol.	Dr. Schuhmacher GmbH, Malsfeld, D
Kallikrein-Standard	Sigma Aldrich
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt, D
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, D
MCA (Pro-Phe-Arg-Methylcoumarylamid)	Calbiochem, San Diego, USA
MgSO <sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, München, D
NaCl (Natriumchlorid)	Braun, Melsungen, D
NaCl Spüllösung	Braun, Melsungen, D
NaF (Natriumfluorid)	Merck, Darmstadt, D
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)	Sigma-Aldrich, München, D
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Merck, Darmstadt, D
PBS (phosphate-buffered saline)	Lonza, Verviers, Belgien
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial, Hallbergmoss, D
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	AppliChem, Darmstadt, D
Pronectin = Fibronectin-like protein	Sigma-Aldrich, München, D
PO <sub>4</sub> -Puffer (Phosphatpuffer)	Sigma-Aldrich, München, D
Ratten Immunglobulin G	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	AppliChem, Darmstadt, D

Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt, D
Trypanblau Färbelösung, 0,4 %	Invitrogen, Auckland, NZ
Trypsin	Merck, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA (10x)	GE Healthcare, Pasching, Austria
Tween®-20	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, D

**Tabelle 2:      Lösungen, Puffer und Kulturmedien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lysis-Puffer	8,29 g NH <sub>4</sub> Cl, 1 g KHCO <sub>3</sub> , 1000 ml H <sub>2</sub> O
Elastase/Trypsin-Lösung	5 mg Elastase und 7 mg Trypsin in 40 ml With-Lösung
Fibronectin/Pronectin-Lösung	10 µg/ml Fibronectin, 50 µg/ml Pronectin in PBS
Lysispuffer zum Lysieren der Zellpellets	50 mmol/l HEPES, 200 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 2,5 mmol/l EGTA, 10 % Glycerin, 0,1 % Tween®-20, 10 mmol/l β-Glycerophosphat, 1 mmol/l NaF, 2 mmol/l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1 mmol/l DDT, 0,1 mmol/l PMSF, 5 µg/ml Leupeptin
Ratten-IgG-Lösung	30 mg Ratten-IgG in 40ml 0,05 mol/l Tris-HCl (pH 9,4)
Tris-Puffer	0,1 M TrisHCl, 0,15 M NaCl (pH 8,0)
Trypanblau-Lösung	Trypan Stain, 0,4 % 1:10 in DMEM (high Glucose)

With-Lösung	0,348 g Glucose, 12 ml 0,15 mol/l KCl, 6 ml 0,11 mol/l CaCl <sub>2</sub> , 3 ml 0,15 mol/l MgSO <sub>4</sub> , 9 ml 0,1 mol/l PO <sub>4</sub> -Puffer, 3,6 ml HEPES 1M in 300 ml isotoner NaCl-Lösung
Without-Lösung	0,015 g EGTA, 0,232 g Glucose, 8 ml 0,15 mol/l KCl, 6 ml 0,1 mol/l PO <sub>4</sub> -Puffer, 2,4 ml HEPES 1M in 200ml isotoner NaCl-Lösung
Zellkulturmedium	DMEM (high Glucose) mit 10 % FKS und 1 % Gentamicin
Medium zur zyklischen Zelldehnung	DMEM (low Glucose) mit 0,2 % FKS und 0,5 % Gentamicin

**Tabelle 3: Assays**

Bezeichnung	Hersteller
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Rat Bradykinin (BK) ELISA Kit	Cusabio, Wuhan, China
Bradykinin EIA Kit (human, rat, mouse)	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, USA
ELISA for Bradykinin Receptor B2	Cloud Clone Corp., Houston, USA
ELISA Kit for Rat Kininogen 1	Uscn Life Sciences Inc., Houston, USA

**Tabelle 4: Geräte und Arbeitsmittel**

Gerät/Arbeitsmittel	Bezeichnung	Hersteller
96 Well Mikrotiterplatten	Falcon® Microtest™ 96	BD Labware, Franklin Lakes, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator	Napco Series 5400 CO <sub>2</sub> -Incubator	Pacific Combustion, Torrance, USA
Dehnapparat  mit Vakuumpumpe	Flexlink Flexercell Strain Unit FX-3000  RV12	Flexcell International, Hillsborough, USA  BOC Edwards, Kirchheim, D
Dehnplatten	BioFlex® Culture Plate	Flexcell International, Hillsborough, USA
Fluoreszenzspektrometer	Infinite® 200 microplate reader	Tecan, Crailsheim, D
Infusionssysteme	Intrafix	B.Braun, Melsungen, D
Kanülen	BD Microlane 25G  Braunüle® MT 14G	BD, Heidelberg, D  B.Braun, Melsungen, D
Kompressen	ES-Kompressen	Hartmann, Heidenheim, D
Mikroskop	Nikon Eclipse TE 300	Nikon, Düsseldorf, D
Nahtmaterial	Vicryl® 4-0	Ethicon, Norderstedt, D
Nylonmembranen	Nylon mesh	Bayer HealthCare, Leverkusen, D
Pipetten	Transferpette®-8 20-200µl  Research 10, 100, 1000µl  Reference 100, 1000 µl	Brand, Wertheim, D  Eppendorf, Hamburg, D  Eppendorf, Hamburg, D

Pipetten	Falcon® Serological Pipet 2, 5, 10, 50 ml	Corning Inc. Life Sciences, Durham, USA
Pipettenspitzen	epTIPS 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Spektrophotometer	Spectra Classic	Tecan, Grödig, Austria
Spritzen	Discardit™	BD Medical, Heidelberg, D
Statische Platten	Falcon® Multiwell 6 Well	Corning Inc. Life Sciences, Durham, USA
Sterilbank mit Vakuumpumpe	HeraSafe KS  UniJet II	Thermo Scientific, Dreieich, D  UniEquip, München, D
Tubes	Falcon® 15, 50 ml  Falcon™ 5ml  Safe Seal Micro Tubes 1,5 ml und 2 ml	Corning Life Sciences, Monterrey, Mexico  BD Biosciences, Erembodegem, Belgien  Sarstedt, Nümbrecht, D
Tubus	Abgeschnittene Kanüle BD Microlance™ 3 18G	BD Medical Systems, Drogheda, Irland
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	BP121S	Sartorius, Göttingen, D
Zählkammer	Neubauer Improved	OptikLabor Ltd, Lancing, UK
Zellkulturschalen	Cellstar® (Ø 10 cm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
	Rotina 46R	Hettich, Tuttlingen, D

**Tabelle 5: Computer-Software**

Software	Hersteller
Excel 2010	Microsoft
Easy WIN Fitting V6.0a	Tecan, Crailsheim, D
Flexcell FX-3000 V3.2	Flexcell International, Hillsborough, USA
i-control <sup>TM</sup> microplate reader software	Tecan, Crailsheim, D
SigmaPlot 12.0	Systat Software, San Jose, USA

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

Für die Zellkulturen wurden alveoläre Typ-II-Zellen (AT-II-Zellen) aus Lungengewebe von gesunden männlichen Sprague-Dawley-Ratten (170-220g) verwendet. Die Versuchstiere stammten aus dem Medizinisch-experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig und wurden direkt vor den Experimenten von dort bezogen.

#### 3.2.1.1. Isolierung der AT-II-Zellen aus der Ratte

Zur Gewinnung der AT-II-Zellen wurde die modifizierte Methode nach Dobbs et al.(1986) angewendet.

Als vorbereitende Maßnahmen wurden zuerst die „With“- und „Without“-Lösungen frisch hergestellt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Anschließend erfolgte die Präparation der Zellkulturschalen zur Makrophagenselektion. Hierfür gab man je 10 ml Ratten-Immunglobulin G-Lösung auf zwei 10 cm-Zellkulturschalen und inkubierte sie 2 h bei 37°C.

Zur Anästhesie der Ratte wurde eine Injektion aus 300 µl Pentobarbital und 300 µl Heparin-Natrium-25000 vorbereitet und dem Versuchstier im 45° Winkel subkutan in den Unterbauch appliziert. Nach circa zehnminütiger Inkubation und Sicherstellung der ausreichenden Betäubung wurde die Ratte an den Extremitäten auf einer Unterlage fixiert und mit Alkohol desinfiziert. Nach großflächiger Eröffnung der Bauchdecke und des Peritoneums konnten die Gedärme nach lateral geschoben werden. Die Bauchaorta wurde angeschnitten und das entströmende Blut mit Tupfern aufgefangen. Der Hautschnitt wurde bis zum Hals erweitert und durch Entfernung von Muskel- und Schilddrüsengewebe die Trachea freigelegt. Unterhalb des Kehlkopfes wurde durch einen Einschnitt zwischen zwei Knorpelspangen ein Tubus eingeführt, der mittels eines Vicrylfadens in der Trachea fixiert wurde. Anschließend wurde mit einer spitzen Schere das Zwerchfell durchbohrt, sodass die Lunge in der Thoraxhöhle kollabierte und der Brustkorb ohne Beschädigung der Lunge seitlich des Sternums aufgeschnitten werden konnte. Der Thymus wurde entfernt und Herz und Lunge freigelegt. Das linke Herzohr wurde abgeschnitten und der rechte Ventrikel so eröffnet, dass eine Pipettenspitze eingeführt werden konnte. Über ein angeschlossenes Infusionssystem wurde circa 80-100 ml „Without“-Lösung in die rechte Herzkammer eingeleitet, während die Lunge über den Tubus mittels einer 10 ml Spritze beatmet wurde. Austretende Flüssigkeit wurde mit Tupfern aufgesaugt. Nach diesem Spülvorgang wurde die nun blassrosa Lunge von Herz und anliegenden Geweben abgetrennt und vorsichtig mitsamt der Trachea und dem darin fixierten Tubus aus dem Thorax herausgelöst.

Außerhalb des Thorax wurde die Lunge auf Kompressen gelegt und über den Tubus nochmals gespült: Zunächst achtmal mit je 7-10 ml „Without“-Lösung, danach zweimal mit „With“-Lösung. Danach wurden 5 ml Elastase/Trypsin-Lösung in die Lunge eingespritzt und 15 min in 37°C warmer Kochsalzlösung inkubiert. Die Lunge war dabei über den Tubus und der daran aufgesteckten Spritze oberhalb des Gefäßes befestigt. Nach der Inkubation wurde der Stempel aus der Spritze entfernt. Innerhalb von 15 min wurden nach und nach die restlichen 35 ml Elastase/Trypsin-Lösung zugegeben und über hydrostatischen Druck durch die Lunge geleitet. Dann wurde die Lunge von der Trachea und anliegendem Bindegewebe abgetrennt und zusammen mit 2 ml „With“-Lösung in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Mittels einer Schere wurde das Lungengewebe auf 1-2 mm große Stücke zerkleinert (sogenanntes „Mincing“) und anschließend mit 5 ml fetalem Kälberserum (FKS) für 2 min in einem Erlenmeyerkolben geschwenkt. Die Gewebesuspension wurde mit 10 ml „With“-Lösung verdünnt,

dreimal durch feiner werdende Nylonmembranen gefiltert (100 µm, 20 µm und 10 µm) und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen.

#### *3.2.1.2. Kultivierung der AT-II-Zellen*

Nach Zentrifugation des Filtrats bei 1100 U/min 5 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 300 g und Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet in 20 ml DMEM (high Glucose Kulturmedium mit 10 % FKS) resuspendiert. Von den vorbereiteten mit Ratten-IgG inkubierten Zellkulturplatten wurde die IgG-Lösung abpipettiert. Die Platten wurden mit je 10 ml der aus der Rattenlunge gewonnenen Zellsuspension beschichtet und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abpipettiert und die Zellplatten mit 10 ml DMEM abgespült. Die Zellsuspension und auch das DMEM wurden in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt und erneut bei 1100 U/min bei 4°C 5 min zentrifugiert. Vor der Zentrifugation wurde 30 µl Zellsuspension entnommen und mit 90 µl Trypanblau vermischt. Für die Zellzählung wurde diese Mischung in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und bei zehnfacher Vergrößerung mikroskopiert. In den vier großen Eckquadraten wurden unter Vermeidung von Doppelzählungen die unbeschädigt erscheinenden AT-II-Zellen ausgezählt. Die Berechnung der Zellgesamtzahl erfolgte nach folgender Formel:

***Mittelwert der Zellzahl der vier großen Eckquadrate x Verdünnungsfaktor (= 4)***

***x 10<sup>4</sup> (Volumen eines großen Eckquadrates = 10<sup>4</sup> ml) = Zellzahl/ml***

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen definiert mit DMEM resuspendiert, sodass eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml Lösung entstand.

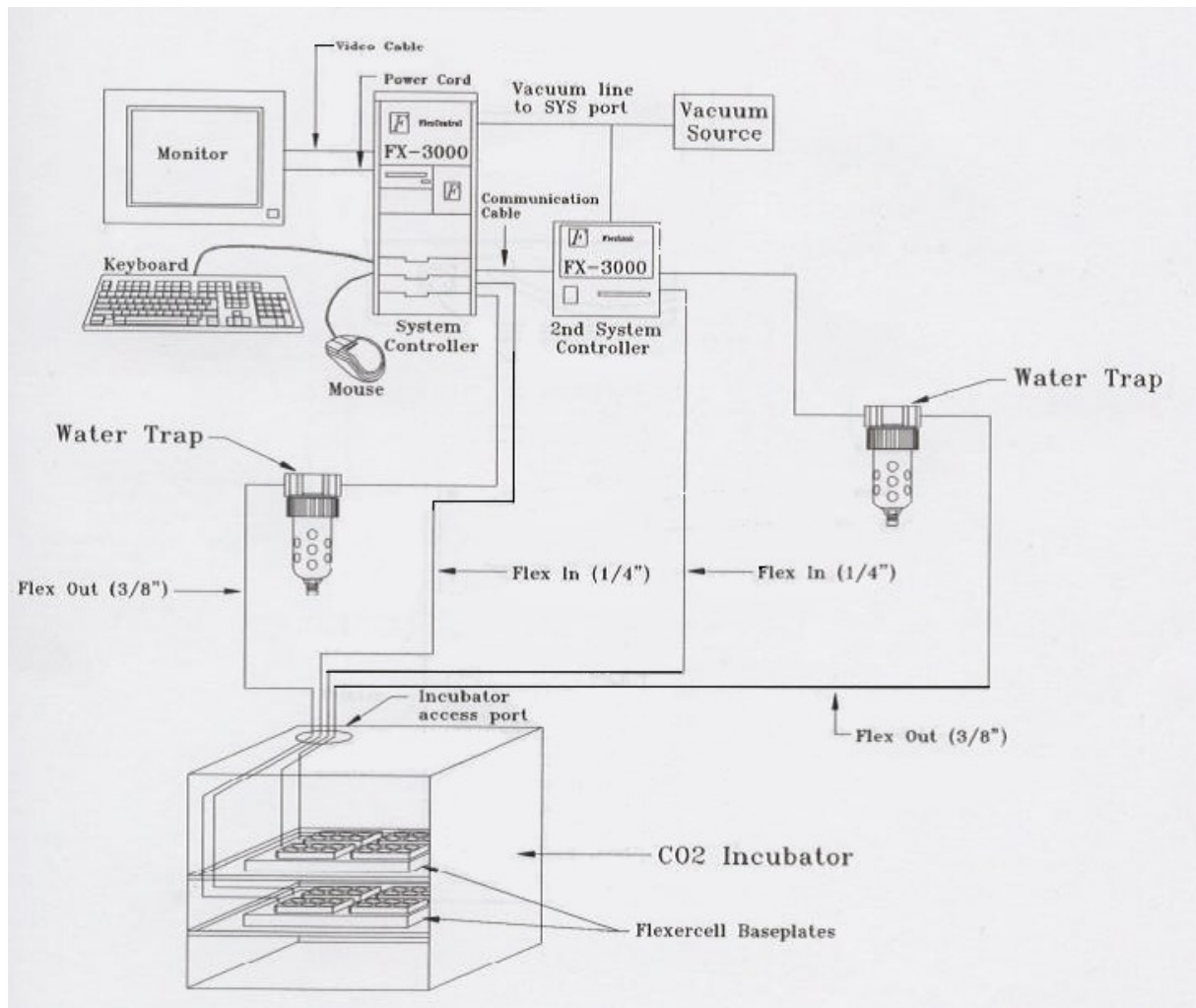
Pro Versuchstier wurden insgesamt vier 6-Well-Platten beschickt. Davon zwei statische Platten und zwei BioFlex®-Platten mit dehnbaren Silikonmembranen. Vor der Aussaat der AT-II-Zellen erfolgte die Beschichtung der 6-Well-Platten mit einer Fibronectin/Pronectin-Lösung. Von dieser Lösung wurden je 600 µl bei den Dehnplatten bzw. je 250 µl bei den statischen Platten mittig in die Kavitäten eingebracht und 30min bei Raumtemperatur



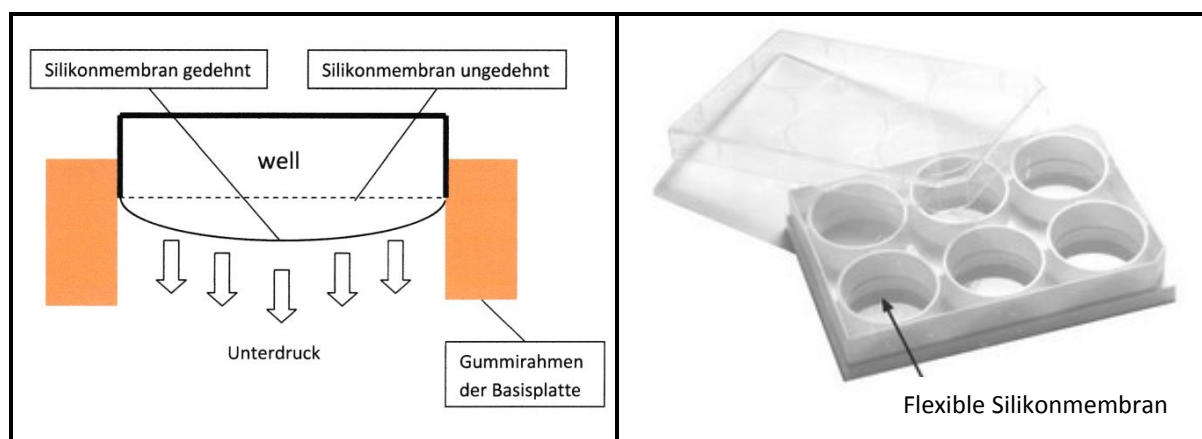
inkubiert. Danach wurde die Fibronectin/Pronectin-Lösung wieder abpipettiert und die Zellsuspension ebenfalls mittig aufgetragen. Pro Kavität wurden circa 1,5 Millionen Zellen ausgesät. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C, während der die Zellen an der Membran anhafteten, wurden je 2 ml Nährmedium DMEM (high Glucose) pro Kavität hinzugegeben und die Platten 24 h wiederum bei 37°C inkubiert. Die Adhärenz wurde mikroskopisch anhand der für die AT-II-Zellen typischen Lammellarkörper kontrolliert.

### 3.2.2. Dehnungsexperiment

Das Dehnungsexperiment wurde mittels der „Flexercell Strain Unit FX 3000“ der Firma Flexcell International für 24 Stunden durchgeführt. Abbildung 3 zeigt den Aufbau der Einheit: Die 6-Well-Platten mit den kultivierten Zellen werden in eine Basisplatte im CO<sup>2</sup>-Brutschrank in abgedichtete Gummirahmen eingesetzt. Diese Basisplatte ist mit dem „2nd System Controller“ verbunden, der die Ausführung der Dehnungsmuster mittels einer angeschlossenen Vakuumpumpe steuert. Mit der Erzeugung von Unterdruck unter den Basisplatten werden die Silikonmembranen der BioFlex® 6-Well-Platten gedehnt (siehe Abbildung 4). Die gewünschten Parameter der Dehnungsmuster werden über die zugehörige Software „Flexcell FX-3000 V3.2“ eingegeben und über den „System Controller“ an den „2nd System Controller“ weitergeleitet. Über rückmeldende Verbindungen (siehe „Flex Out“ in Abbildung 3) kann die korrekte Ausführung der Parameter kontrolliert werden.



**Abbildung 3: Aufbau des Dehnungsapparates „Flexercell Strain Unit FX-3000“.** Abbildung entnommen aus der zugehörigen Beschreibung (S. 22).



**Abbildung 4: Wirkungsprinzip der Dehnung.** Schematischer Querschnitt durch Basisplatte mit eingesetzter BioFlex® 6-Well-Platte (links) und Foto einer BioFlex® 6-Well-Platte (rechts).

Vor dem Dehnungsexperiment wurde nochmal ein Mediumwechsel der Zellkulturen vorgenommen: Das während der Inkubationszeit in den Kavitäten befindliche Medium wurde abgesaugt, der Zellrasen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und anschließend in jede Kavität 3 ml DMEM Medium (low Glucose mit 0,2 % FKS und 1 % Gentamicin, auf 37°C erwärmt) gegeben.

Beim Einsatz der Dehnplatten in die Basisplatten der „Flexercell Strain Unit“ wurde sichergestellt, dass die Gummirahmen die Platten dicht umschlossen und alle Dehnungsplätze von Platten belegt waren, damit sich das Vakuum in korrekter Weise aufbauen konnte. Eventuell nötige Leerplatten wurden mit 3ml Wasser pro Well befüllt. Die statischen Platten wurden für die Dauer der Dehnung ebenfalls im Brutschrank aufbewahrt.

Als Dehnungsmuster wurden eine Frequenz von 40/min und eine Amplitude von 30 % Oberflächenvergrößerung ausgewählt. Die Frequenz soll der Atmung der Ratte annäherungsweise gleichkommen. Die Amplitude entspricht etwa der maximalen Inspiration, bei der sich die Lunge bis zu 100 % inflatiert (totale Lungenkapazität), während sich die Oberfläche der Basalmembran um 30 - 35 % vergrößert (Tschumperlin 1999).

### 3.2.3. Gewinnung von Analysematerial

Nach 24 Stunden wurde die Dehnung gestoppt und die betreffenden Platten aus dem Brutschrank entnommen. Die Überstände wurden abpipettiert, bei 300 g und 4°C 7 min zentrifugiert und dann bei -32°C tiefgefroren.

Für die Analytik der Zellen wurden Zellpellets hergestellt: Der Zellrasen wurde zunächst mit PBS gewaschen. Um die Membranadhärenz der Zellen zu lösen wurde 1 ml Accutase pro Well hinzugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 ml DMEM (high Glucose, 10 % FKS) abgestoppt. Der Inhalt der Kavitäten wurde dann jeweils in 2 ml-Tubes abpipettiert und bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschvorgang der Zellen mit PBS und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet bei -32°C tiefgefroren.

### 3.2.4. Auswertung der Experimente

#### 3.2.4.1. Bestimmung des Proteingehaltes

Materialien:

- Lysispuffer zum Lysieren der Zellpellets (siehe Tabelle 2)
- BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit
  - BCA<sup>TM</sup> Reagent A bestehend aus Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bizinchoninsäure (BCA) und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid
  - BCA<sup>TM</sup> Reagent B bestehend aus 4 % Kupfersulfat
  - Albumin Standard 2 mg/ml
- Mikrotiterplatte und Acetatfolie zum Abkleben

Für die Proteinbestimmung mussten die Zellpellets zunächst lysiert werden: Je 100 µl frisch hergestellter Lysispuffer wurde auf  $10^6$  Zellen gegeben und 90 min bei 4°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben alle 10 min gevortext. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4°C zentrifugiert (14.000 U/min) und die Überstände zur sofortigen Weiterverarbeitung abpipettiert.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit durchgeführt, welches auf der Methode von Smith et al. (1985) basiert: Im ersten Schritt wird die sogenannte Biuret-Reaktion durchgeführt, bei der  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischem Medium von Eiweißmolekülen zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird. Im zweiten Schritt reagiert die Bizinchoninsäure (BCA) mit dem reduzierten Kupferion. Das führt zu einem intensiv violett gefärbten BCA/Kupfer-Komplex, der bei ansteigendem Proteingehalt eine streng lineare Absorption bei 562 nm aufweist.

Die Eichkurve wurde aus Albumin-Standard mit folgenden Verdünnungen in mg/ml angelegt:  $S_1 = 1,000$ ;  $S_2 = 0,500$ ;  $S_3 = 0,250$ ;  $S_4 = 0,125$ ;  $S_5 = 0,063$ ;  $S_6 = 0,032$ ;  $S_7 = 0,016$ . Sowohl die Probenlysate als auch der Lysispuffer, der als Leerwert diente, wurden 1:5 mit PBS verdünnt. Der „working reagent“ wurde aus den mitgelieferten Reagenten A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt (1 Teil Reagent B + 49 Teile Reagent A) und je 200 µl auf 10 µl Probenlysate, Leerwerte und Standardlösungen aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde dann mit Acetatfolie abgeklebt, um während der 30 minütigen Inkubation bei 37°C relevante

Probenverdunstung zu verhindern. Sofort im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung bei  $\lambda = 560 \text{ nm}$ .

Alle nachfolgenden Konzentrationsbestimmungen, die aus Zelllysaten erfolgten, wurden mit der in der jeweiligen Probe vorliegenden Gesamtproteinkonzentration verrechnet und werden daher in „Nanogramm pro Milligramm Protein“ (ng/mg) angegeben.

#### 3.2.4.2. *Bestimmung der Kininogen-Konzentration*

Materialien:

- ELISA Kit for Rat Kininogen 1
  - Immunoplatte beschichtet mit Kininogen 1-spezifischen monoklonalen Antikörpern
  - Detection Reagent A: biotinylierter polyklonaler Antikörper, Kininogen-spezifisch
  - Detection Reagent B: mit Avidin konjugierte Horseradish-Peroxidase
  - Standard, TMB Substratlösung, Abstopp-Lösung, Waschpuffer

Die Kininogen 1-Konzentration wurde mithilfe eines Sandwich-ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) quantifiziert. Hierbei wird Kininogen zunächst von den spezifischen Antikörpern auf der beschichteten Immunoplatte gebunden (Capture-Antikörper). Ein ebenfalls für Ratten-Kininogen 1 spezifischer Detection-Antikörper bindet anschließend an anderer Bindungsstelle am Kininogen-Molekül. Dieser „Sandwich“ aus Capture-Antikörper, Kininogen-Molekül und Detection-Antikörper kann dann über eine Farbsubstrat-Reaktion mit TMB, die durch die Horseradish-Peroxidase katalysiert wird, photometrisch bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  nachgewiesen werden. Die Intensität des Farbumschlags ist dabei proportional zur Menge des vorliegenden Kininogens.

Die Kininogen 1-Konzentration wurde in Lysaten (in 1:2-Verdünnung) und in Überständen bestimmt. Der Capture- und der Detection-Antikörper des ELISA-Kits waren für Ratten-Kininogen 1 spezifisch.

Die Eichkurve wurde mit folgenden Konzentrationen des Standard-Peptids in ng/ml erstellt:  
 $S_1 = 20$ ;  $S_2 = 10$ ;  $S_3 = 5$ ;  $S_4 = 2,5$ ;  $S_5 = 1,25$ ;  $S_6 = 0,625$ ;  $S_7 = 0,312$ ;  $S_8 = 0,156$ . Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß dem zugehörigen Protokoll in folgenden Arbeitsschritten:

- Eingabe von 100  $\mu$ l Standard/Probe/Leerwert in die vorgesehenen Wells der Immunoplatte, dann Inkubation für 2h bei 37°C.
- Aspiration der Flüssigkeit aus den Wells, KEIN Waschvorgang.
- Eingabe von 100  $\mu$ l Detection Reagent A pro Well, dann Inkubation für 1h bei 37°C.
- Aspiration und dreimaliges Waschen mit 350  $\mu$ l Waschpuffer je Well.
- Eingabe von 100  $\mu$ l Detection Reagent B pro Well, Inkubation für 30 min bei 37°C.
- Aspiration und fünfmaliges Waschen mit 350  $\mu$ l Waschpuffer je Well.
- Eingabe von 90  $\mu$ l TMB Substratlösung pro Well, Inkubation für 15-20 min bei 37°C im Dunkeln (Farbumschlag zu blau).
- Zugabe von 50  $\mu$ l Abstopp-Lösung pro Well (Farbumschlag zu gelb), nach Säubern der Plattenunterseite sofortige Extinktionsmessung.

Die Extinktion wurde bei  $\lambda = 450\text{nm}$  gemessen, wobei sich die Farbintensität proportional zur Kininogen 1-Konzentration verhielt.

#### 3.2.4.3. Bestimmung der Kallikrein-Aktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie

Materialien:

- TrisPuffer: 0,1 M TrisHCl + 0,15 M NaCl (pH 8,0)
- Substrat-Lösung: 0,1 mM MCA (Pro-Phe-Arg-Methylcoumarylamid in DMSO (Dimethylsulfoxid) lösen (10 mM), dann 1:100 mit TrisPuffer verdünnen)
- Kallikrein-Standard (Sigma Aldrich)
- Infinite 200 microplate reader, software i-control (Tecan)

Die Fluoreszenzspektroskopie misst die Emission von Strahlung aus einem durch Absorption angeregten System. Bei der Kallikrein-Aktivitätsmessung ist das fluoreszierende Methylcoumarylamid (MCA) als Substrat mit einer kurzen Peptidsequenz konjugiert, die von der Serinprotease Kallikrein zerlegt wird. Die Emission des freigegebenen MCA wird dann mittels Fluoreszenzspektrometer gemessen. Eine Unit Kallikrein-Aktivität setzt in 5 Minuten 1 nM Methylcoumarylamid frei.

Die Eichkurve wurde mit folgenden Konzentrationen an Kallikrein in U/ml angefertigt, zur Dilution wurde entionisiertes Wasser verwendet: S1 = 1; S2 = 0,5; S3 = 0,25; S4 = 0,125; S5 = 0,062; S6 = 0,031; S7 = 0,0155; S8 = 0,008. Als Leerwert wurde 0,2 % FKS-haltiges DMEM, als Negativkontrolle wurde TrisHCl/NaCl-Puffer verwendet. Die Bestimmung wurde sowohl in den Zelllysaten (1:5 mit TrisPuffer verdünnt) als auch in den Überständen vorgenommen. Je 100 µl Probe wurden in einer durchsichtigen 96er Mikrotiterplatte vorgelegt und dann je 100 µl Substratlösung hinzugegeben. Bei einer Exzitationswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm wurde die Messung in den ersten fünf Minuten nach dem Auftragen der Proben mehrfach durchgeführt.

#### 3.2.4.4. Bestimmung der Bradykinin-Konzentration

Materialien:

- Rat Bradykinin (BK) ELISA (Cusabio)
  - Immunoplatte mit BK-spezifischen Antikörpern beschichtet (Capture-Antikörper)
  - Standard
  - Detection-Antikörper: BK-spezifischer biotinylierter Antikörper und Diluent
  - Streptavidin-Horseradish Peroxidase und Diluent
  - Proben Diluent
  - TMB-Substratlösung, Abstopp-Lösung, Waschpuffer

Die Bradykinin-Konzentration wurde in den Überständen ebenfalls mithilfe eines quantitativen Sandwich-ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) bestimmt.

Bradykinin wurde zunächst von den spezifischen Antikörpern auf der beschichteten Immunoplatte gebunden (Capture-Antikörper). Nach Zugabe des für Ratten-Bradykinin spezifischen Detection-Antikörper wurde Bradykinin über eine Farbsubstrat-Reaktion mit TMB, die durch die Horseradish-Peroxidase katalysiert wird, photometrisch bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  quantifiziert. Die Intensität des Farbumschlags ist dabei proportional zur Menge des vorliegenden Bradykinins.

Die Eichkurve wurde mit folgenden Verdünnungen des Standards in pg/ml hergestellt:  $S_1 = 50$ ;  $S_2 = 25$ ;  $S_3 = 12,5$ ;  $S_4 = 6,25$ ;  $S_5 = 3,12$ ;  $S_6 = 1,56$ ;  $S_7 = 0,78$ . Als Leerwert diente der Proben Diluent. Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß dem mitgelieferten Protokoll in folgenden Arbeitsschritten:

- Eingabe von 100  $\mu\text{l}$  Standard/Probe/Leerwert in die vorgesehenen Wells der Immunoplatte, Inkubation für 2h bei 37°C.
- Aspiration der Flüssigkeit aus den Wells, KEIN Waschvorgang.
- Eingabe von 100  $\mu\text{l}$  Detection-Antikörper pro Well, Inkubation für 1h bei 37°C.
- Aspiration und dreimaliges Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer je Well.
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Streptavidin-Horseradish-Peroxidase pro Well, Inkubation für 1h bei 37°C.
- Aspiration und fünfmaliges Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer je Well.
- Eingabe von 90  $\mu\text{l}$  TMB-Substratlösung pro Well, Inkubation für 15-20 min bei 37°C im Dunkeln (Farbumschlag zu blau).
- Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Abstopp-Lösung pro Well (Farbumschlag zu gelb), nach Säubern der Plattenunterseite sofortige Extinktionsmessung bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .



#### 3.2.4.5. Bestimmung der Bradykinin-abbauenden Aktivität

Materialien:

- Bradykinin Enzyme Immunoassay EIA (Phoenix Pharmaceuticals, INC)
  - Immunoplatte mit sekundären Antikörpern beschichtet
  - Serum mit primären Antikörpern
  - Standard-Peptid
  - Biotinyliertes Peptid
  - Streptavidin-Horseradish Peroxidase; TMB-Substratlösung
  - Assaypuffer
  - Abstopp-Lösung: 2N HCl (Salzsäure)

Die Bradykinin-abbauende Aktivität wurde in den Überständen gemessen. Mithilfe des Standardpeptids wurde Bradykinin in einer definierten Ausgangskonzentration von 2  $\mu\text{mol/l}$  vorgelegt und mit 100  $\mu\text{l}$  Dehnungsmedium (0,2 % FKS-haltigem DMEM low Glucose) bzw. 100  $\mu\text{l}$  der statischen oder gedehnten Überstände versetzt. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die verbleibenden Bradykinin-Konzentrationen in den Proben mithilfe eines kompetitiven Enzym-Immunoassays (EIA) bestimmt. Die im Kit enthaltene Immunoplatte ist mit sekundären Antikörpern beschichtet, an die der primäre Antikörper binden kann. Das in den Überständen enthaltene Bradykinin bzw. das Standard-Peptid konkurriert mit einem anfärbbaren biotinylierten Peptid um die Bindung am Fc-Fragment dieses primären Antikörpers. Die Peroxidase katalysiert dann eine Farbreaktion am gebundenen biotinylierten Peptid. Die Farbausprägung ist also proportional zur Menge des gebundenen biotinylierten Peptids, das bedeutet umgekehrt proportional zur Menge des vorhandenen Bradykinins.

Die Eichkurve wurde mit folgenden Verdünnungen des Standardpeptids in ng/ml hergestellt:  $S_1 = 100$ ;  $S_2 = 10$ ;  $S_3 = 1$ ;  $S_4 = 0,1$ ;  $S_5 = 0,01$ . Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß dem mitgelieferten Protokoll in folgenden Arbeitsschritten:

- Eingabe von 50 µl Standard/Probe/Leerwert in die vorgesehenen Wells der Immunoplatte.
- Zugabe von 25 µl primärem Antikörper-Serum pro Well und 25 µl biotinyliertem Peptid pro Well (außer in die der Leerwerte).
- Die Platte mit Folie abkleben und für 2h bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte (300-400 U/min) inkubieren.
- Aspiration der Flüssigkeit aus den Wells und viermaliger Waschvorgang mit 350 µl Assaypuffer pro Well.
- Eingabe von 100 µl Streptavidin-Horseradish-Peroxidase pro Well, Inkubation für 1h bei Raumtemperatur (Farbumschlag zu blau).
- Aspiration der Flüssigkeit aus den Wells und viermaliger Waschvorgang mit 350 µl Assaypuffer pro Well.
- Eingabe von 100 µl TMB-Substratlösung pro Well, Inkubation für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Zugabe von 100 µl Abstopp-Lösung (2N HCl) pro Well (Farbumschlag zu gelb).
- Sofortige Extinktionsmessung bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

Bradykinin hat in humanem Serum nur eine Halbwertszeit von unter 30 Sekunden (Cyr et al. 2001), da es von verschiedenen Enzymen sehr schnell abgebaut wird, um die Bradykinin Wirkungen lokal zu kontrollieren und eine Disseminierung im Körper zu vermeiden. Im verwendeten Dehnungsmedium ist 0,2 % fetales Kälberserum und somit sind BK-abbauende Serumproteasen enthalten, daher wurde auch der BK-Abbau im Dehnungsmedium wie oben beschrieben bestimmt und die nach zweistündiger Inkubation darin verbliebene Bradykinin-Konzentration als 100 % Ausgangskonzentration für die Bestimmungen in den statischen und gedehnten Überständen festgelegt. Die verbliebenen Bradykinin-Konzentrationen in den Überständen der statischen und gedehnten Zellen wurden also in Relation zum BK-Abbau im Dehnungsmedium gesetzt.

#### 3.2.4.6. Konzentrationsbestimmung des Bradykinin-Rezeptors 2

Materialien:

- ELISA for Bradykinin Receptor B2 (Cloud-Clone-Corp.)
  - 96er Immunoplatte beschichtet mit Bradykinin-Rezeptor 2 spezifischen Antikörpern
  - Detection Reagent A: biotinylierter Antikörper spezifisch für Bradykinin-Rezeptor 2
  - Detection Reagent B: mit Avidin konjugierte Horseradish-Peroxidase
  - Standard; TMB Substratlösung; Abstopp-Lösung; Waschpuffer

Bradykinin-Rezeptor 2 wurde sowohl in den Zelllysaten (in 1:2,5-Verdünnung) als auch in den Überständen quantifiziert. Der Immunoassay folgte ebenfalls dem bereits beschriebenen Sandwich-Prinzip, siehe Abschnitt 3.2.4.2. Der Capture- und der Detection-Antikörper waren hier für den Bradykinin-Rezeptor 2 spezifisch.

Die Eichkurve wurde mit folgenden Konzentrationen des Standard-Peptids in ng/ml erstellt:

$S_1 = 10$ ;  $S_2 = 5$ ;  $S_3 = 2,5$ ;  $S_4 = 1,25$ ;  $S_5 = 0,625$ ;  $S_6 = 0,312$ ;  $S_7 = 0,156$ ;  $S_8 = 0,078$ . Die

Durchführung des Assays erfolgte gemäß dem zugehörigen Protokoll in folgenden Schritten:

- Eingabe von 100 µl Standard/Probe/Leerwert in die vorgesehenen Wells der 96er Immunoplatte, dann Inkubation über Nacht bei 4°C.
- Aspiration der Flüssigkeit aus den Wells, KEIN Waschvorgang.
- Eingabe von 100 µl Detection Reagenz A, Inkubation für 1h bei 37°C.
- Aspiration und dreimaliger Waschvorgang mit 350 µl Waschpuffer pro Well.
- Eingabe von 100 µl Detection Reagenz B, Inkubation für 30 min bei 37°C.
- Aspiration und fünfmaliger Waschvorgang mit 350 µl Waschpuffer pro Well.
- Eingabe von 90 µl TMB-Substratlösung, Inkubation für 15-20 min bei 37°C im Dunkeln (Farbumschlag zu blau).
- Zugabe von 50 µl Abstopp-Lösung (Farbumschlag zu gelb), nach Säubern der Plattenunterseite sofortige Extinktionsmessung.

Die Extinktion wurde bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  gemessen, wobei die Farbintensität proportional zur Menge des vorliegenden B<sub>2</sub>-Rezeptors ist.

### 3.2.5. Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung sämtlicher Daten erfolgte mit dem Programm „SigmaPlot“ Version 12.0.

Es wurde der gepaarte t-Test für abhängige Stichproben angewendet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt, d.h. ein p-Wert  $< 0,05$  (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 5\%$ ) entspricht einem signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben, n stellt die Anzahl der durchgeführten Versuche dar.

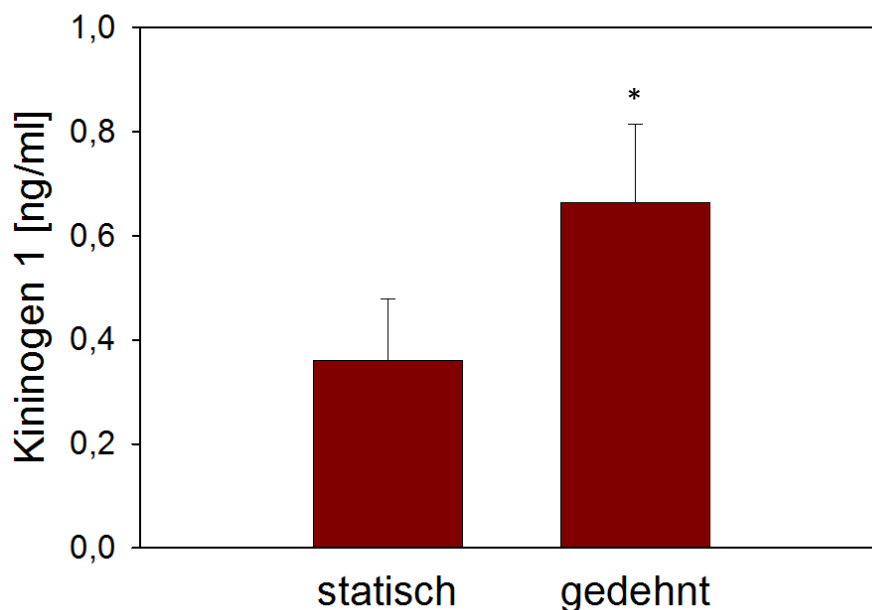
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Beeinflussung des Kinin-Kallikrein-Systems

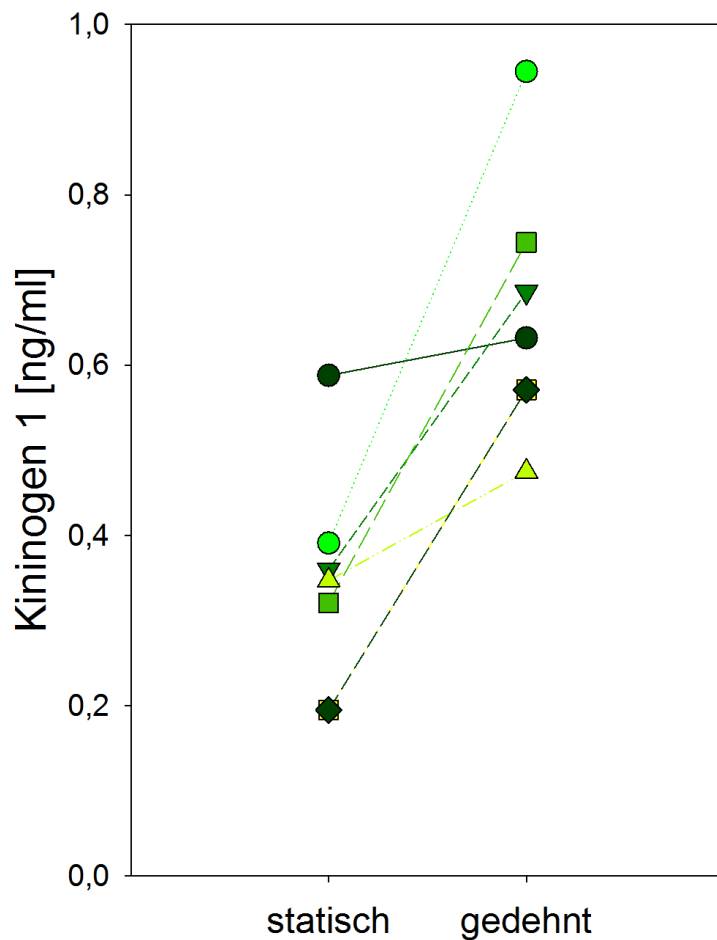
#### 4.1.1. Kininogen

Kininogen, das Vorläuferprotein der aktiven Peptide Bradykinin und Lys-Bradykinin (Kallidin) (Sainz et al. 2007), wurde in den Überständen gedehnter Zellen in signifikant erhöhten Konzentrationen (durch \* gekennzeichnet) gegenüber den Überständen ungedehnter Zellen nachgewiesen (Abbildung 5). Die Kininogen-Konzentration in Überständen ungedehnter Zellkulturen betrug durchschnittlich  $0,36 \pm 0,12$  ng/ml Überstand. In gedehnten Zellkulturen stieg sie auf durchschnittlich  $0,66 \pm 0,15$  ng/ml Überstand, was einer Zunahme um 84 % entspricht. Abbildung 6 zeigt die Einzelkonzentrationen der Versuchsergebnisse. Ein dehnungsinduzierter Anstieg der Kininogen-Konzentration in den Überständen war bei jeder einzelnen Probe ( $n = 7$ ) zu verzeichnen.

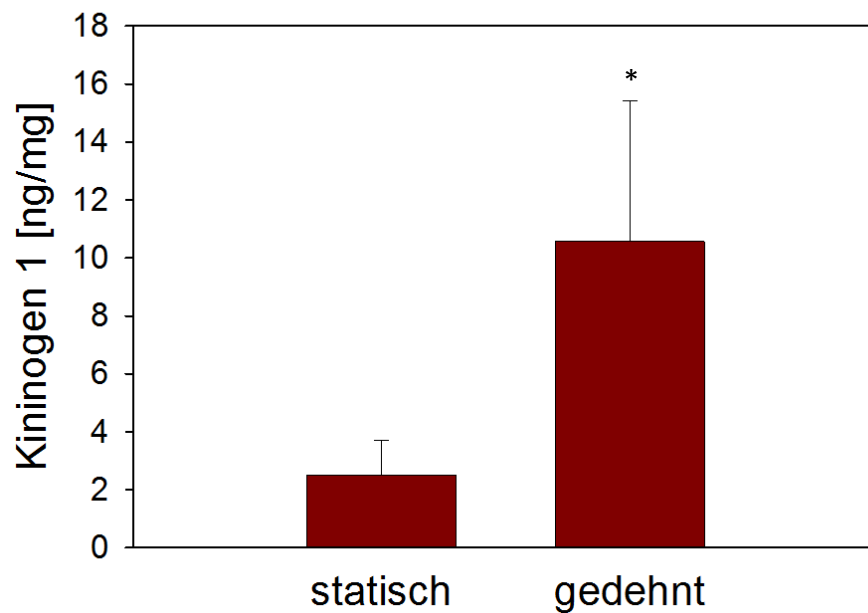
In den Lysaten zeigten die gemessenen Kininogen-Konzentrationen ebenfalls einen signifikanten dehnungsinduzierten Anstieg. Sie wurden zur jeweiligen Gesamtproteinkonzentration in der Probe in Beziehung gesetzt und sind daher in „ng/mg“ (Nanogramm pro Milligramm Protein) angegeben (Abbildung 7).



**Abbildung 5: Kininogen 1-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen**  
AT-II-Zellen wurden für 24 Stunden zyklischer Dehnung ausgesetzt, anschließend wurde mittels ELISA die Kininogen 1-Konzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter Zellen gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SD, Versuchsanzahl  $n = 7$ , \*  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 6:** Anstieg der Kininogen-Einzelkonzentrationen in den Überständen von statischen und gedehnten AT-II-Zellkulturen. (n = 7)



**Abbildung 7:** Kininogen 1-Konzentration in Zelllysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen

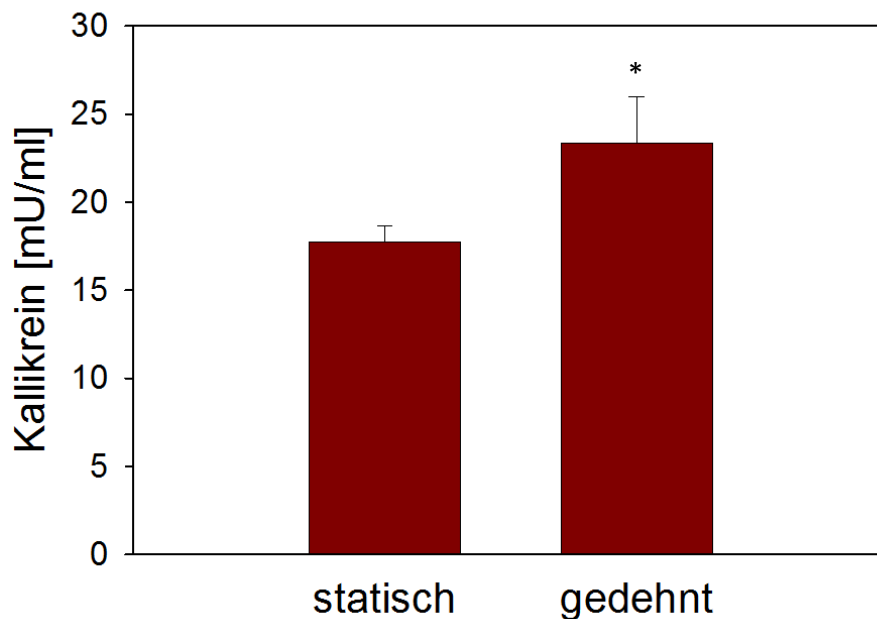
Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels ELISA die Kininogen 1-Konzentrationen in den Lysaten gedehnter und statischer AT-II-Zellen bestimmt und zur Gesamtproteinkonzentration in der jeweiligen Probe in Beziehung gesetzt (MW  $\pm$  SD, n = 6, \* p < 0,05).

#### 4.1.2. Kallikrein

Kallikrein, eine Serinprotease, spaltet Kininogene und setzt so Bradykinin und Bradykinin-verwandte Peptide frei (Kashuba et al. 2013).

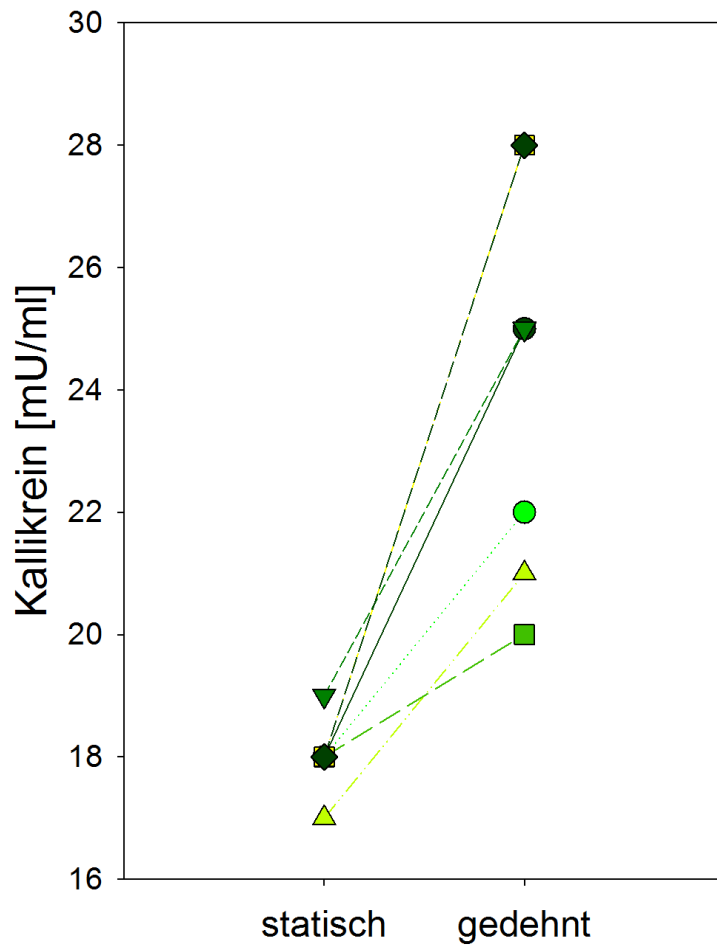
Bei Untersuchung der Kallikrein-Aktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte in den Überständen der gedehnten Proben eine signifikante Aktivitätszunahme registriert werden. Abbildung 8 zeigt die Aktivitätssteigerung in den Überständen anhand der Mittelwerte; im Durchschnitt stieg die Aktivität um 32 % an. In Abbildung 9 sind die Einzelergebnisse der Aktivitätsmessung in den Überständen dargestellt: Eine dehnungsbedingte Zunahme konnte in jeder einzelnen der sieben Proben verifiziert werden.

In den Lysaten wurde eine Aktivitätssteigerung um knapp 60 % verzeichnet: Der Mittelwert statischer Proben lag bei  $36,06 \pm 6,38$  mU/ml, während er in Lysaten gedehnter AT-II-Zellen auf  $57,16 \pm 27,12$  mU/ml zunahm (Abbildung 10).

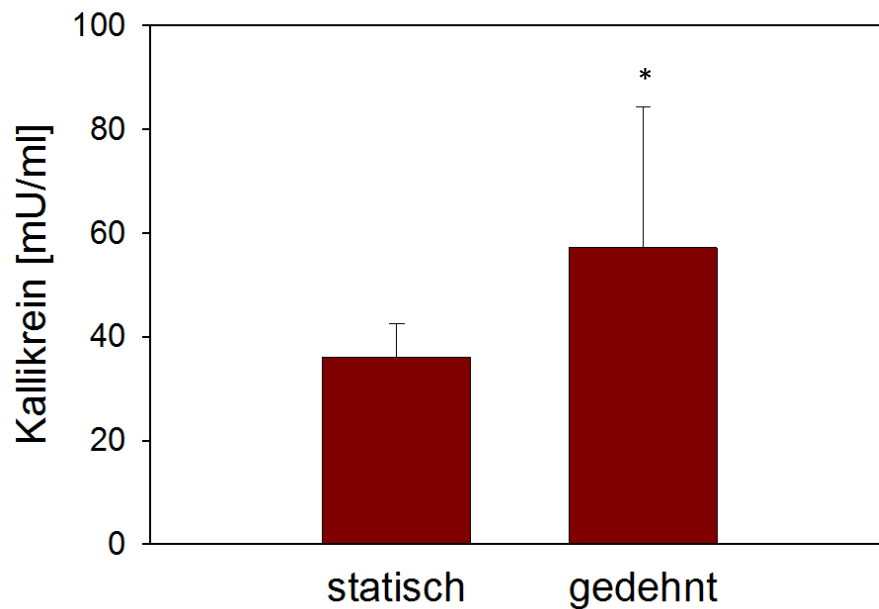


**Abbildung 8: Kallikrein-Aktivität in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen**

Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie die Kallikrein-Aktivität in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 7, \* p < 0,05).



**Abbildung 9:** Anstieg der Kallikrein-Aktivität in den Einzelproben der Überstände statischer und gedehnter AT-II-Zellen. (n = 7)



**Abbildung 10:** Kallikrein-Aktivität in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.

Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie die Kallikrein-Aktivität in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 9, \* p < 0,05).

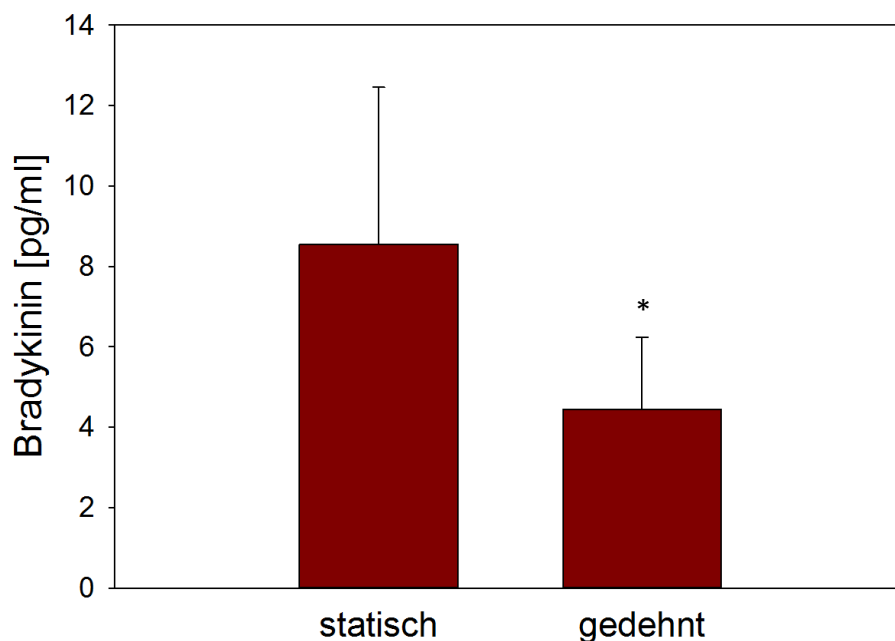


### 4.1.3. Bradykinin-Konzentration

Das Autakoid Bradykinin ist die zentrale Komponente des Kinin-Kallikrein-Systems. Seine kurze Sequenz aus neun Peptiden wird durch Kallikreine aus HMWK und LMWK freigesetzt (Kashuba et al. 2013).

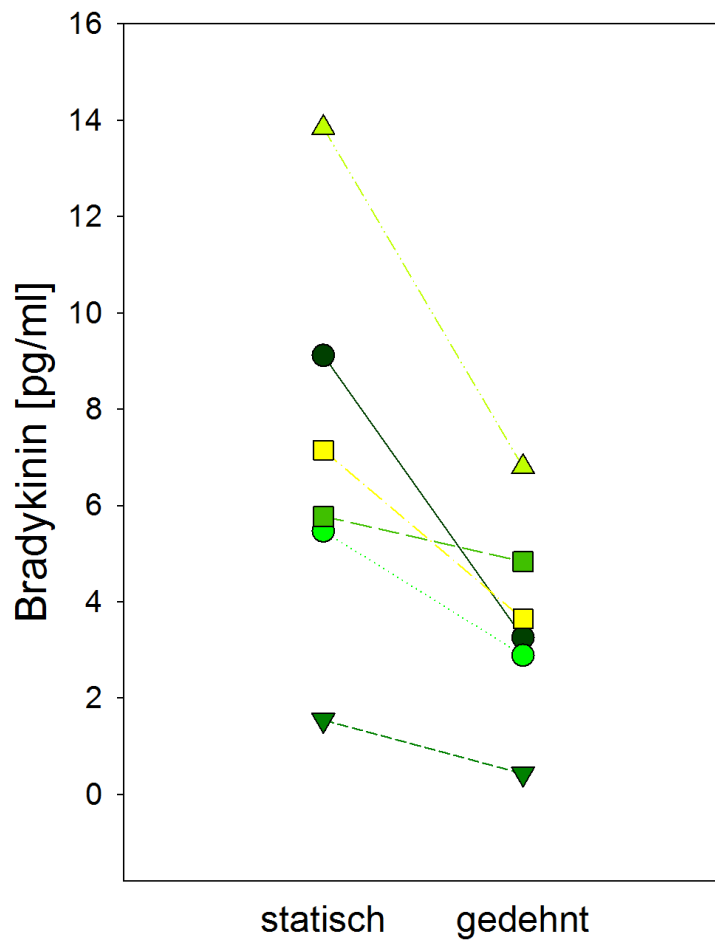
Die Bradykinin-Konzentration wurde in den Überständen mithilfe eines quantitativen Sandwich ELISAs bestimmt. Es konnte ein signifikanter Konzentrationsabfall in den Überständen gedehnter Zellen im Vergleich zu denen statischer Zellen nachgewiesen werden. Die Bradykinin-Konzentration verringert sich dehnungsinduziert um knapp die Hälfte (48%) der Konzentration in statischen Überständen (Abbildung 11).

In Abbildung 12 sind wiederum die Einzelkonzentrationen dargestellt. Die einheitliche Tendenz der Konzentrationsabnahme ist in jeder der sechs Proben zu sehen.



**Abbildung 11: Bradykinin-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.**

AT-II-Zellen wurden für 24 Stunden zyklischer Dehnung ausgesetzt, anschließend wurde mittels ELISA die Bradykinin-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter Zellen gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6, \* p < 0,05).



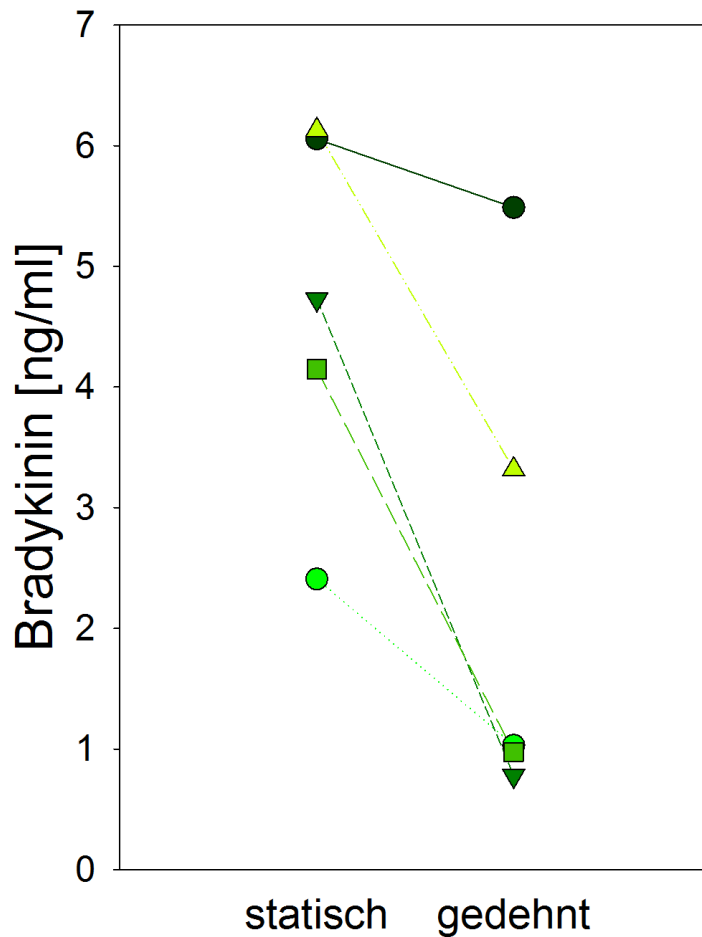
**Abbildung 12:** Bradykinin-Einzelkonzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen. (n = 6)

#### 4.1.4. Bradykinin-Abbau

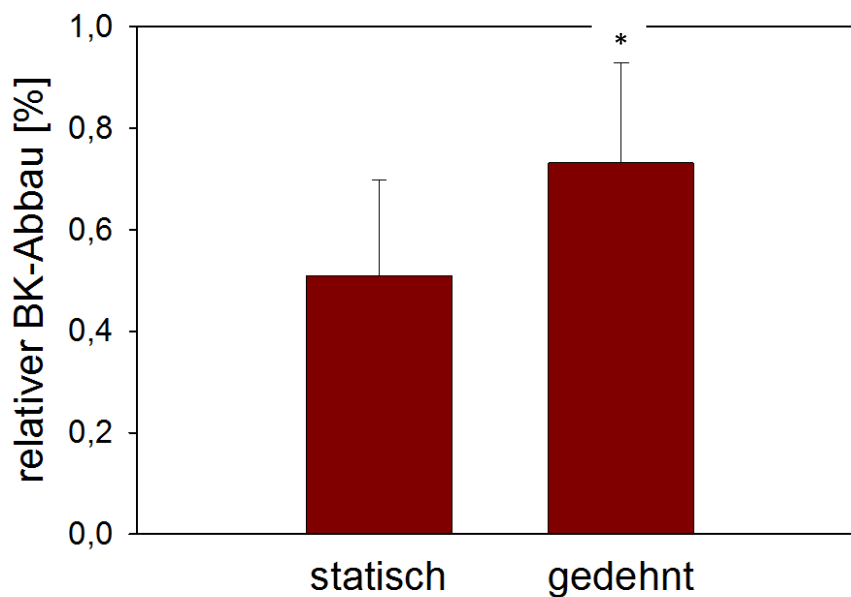
Bradykinin wird von unterschiedlichen Enzymen abgebaut: durch die Carboxypeptidasen CPN im Plasma und CPM auf Zellmembranen, durch das Angiotensin-konvertierende Enzym ACE und durch die Neutrale Endopeptidase NEP (Kashuba et al. 2013).

Bei der Messung des Bradykinin-Abbaus wurde festgestellt, dass Bradykinin in den Überständen der gedehnten AT-II-Zellen signifikant stärker abgebaut wird als in den Überständen ungedehnter AT-II-Zellen. Die Einzelkonzentrationen sind in Abbildung 13 zu sehen: In allen sechs Überständen gedehnter AT-II-Zellen ist nach zwei Stunden Inkubation weniger Bradykinin nachweisbar als in den Überständen ungedehnter AT-II-Zellkulturen.

Im Allgemeinen unterliegt Bradykinin einem raschen Abbau durch Proteasen (Cyr et al. 2001). Dieser Abbau wird offenbar durch den Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung deutlich verstärkt. In Abbildung 14 ist der relative Bradykinin-Abbau dargestellt: Die nach zweistündiger Inkubation von der definierten Ausgangskonzentration verbliebenen Bradykinin-Konzentrationen in den Überständen der statischen und gedehnten Zellen wurden in Relation zur verbliebenen Bradykinin-Konzentration im Dehnungsmedium gesetzt. Die verbliebene Bradykinin-Konzentration im Dehnungsmedium wurde als 100 % angesehen, da sie den Abbau von Bradykinin durch Serumproteasen aus fetalem Kälberserum darstellt. Fetales Kälberserum wird dem Dehnungsmedium zum Erhalt der Zellkultur zugesetzt und ist so gesehen eine dem *in vitro*-Experiment geschuldete exogene Komponente, deren Einfluss aus den Ergebnissen der vorliegenden Bestimmung herausgerechnet werden muss. Aus der relativen Darstellung ergab sich Folgendes: In den Überständen gedehnter Zellen wurde während der zweistündigen Inkubationszeit im Mittel 73 % des vorliegenden Bradykinins abgebaut. Im Vergleich zu den Überständen ungedehnter Zellen, in denen im Mittel 50 % des vorliegenden Bradykinins abgebaut wurden, wird der starke Anstieg der Bradykinin-abbauenden Aktivität durch zyklische mechanische Überdehnung deutlich.



**Abbildung 13: Bradykinin-Abbau: Einzelkonzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen** Eine definierte Bradykinin-Ausgangskonzentration ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) wurde für zwei Stunden in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden mittels EIA die Bradykinin-Konzentrationen in den einzelnen Proben bestimmt. ( $n = 5$ )



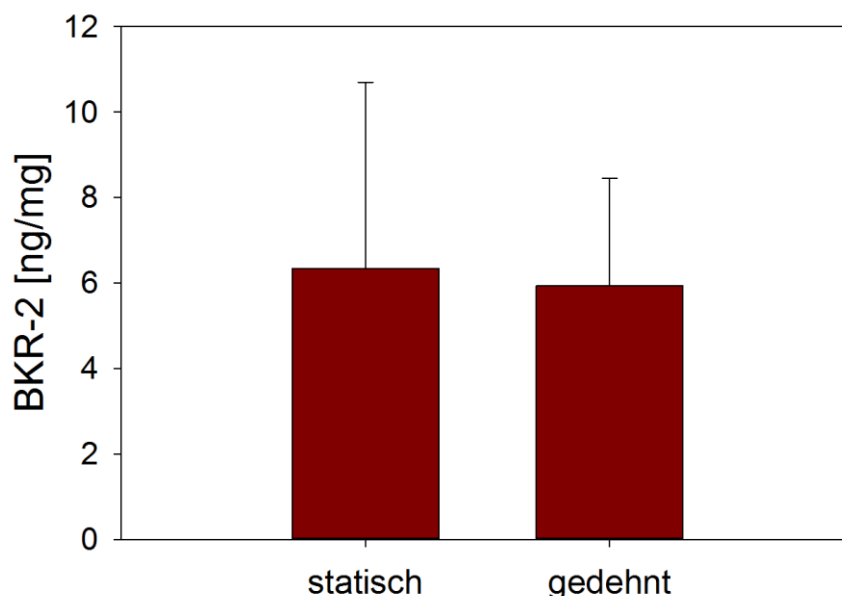
**Abbildung 14: relativer Bradykinin-Abbau in den Überständen von statischen und gedehnten AT-II-Zellen** prozentuale Darstellung des BK-Abbaus in den Überständen in Relation zum Bradykinin-Abbau im Dehnungsmedium (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 9$ , \*  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5. Bradykinin-Rezeptor 2

Bradykinin entfaltet seine Wirkung über eine spezifische Bindungsstelle am B<sub>2</sub>-Rezeptor (Kuhr et al. 2010) und beeinflusst so komplexe intrazelluläre Signalwege (Kashuba et al. 2013).

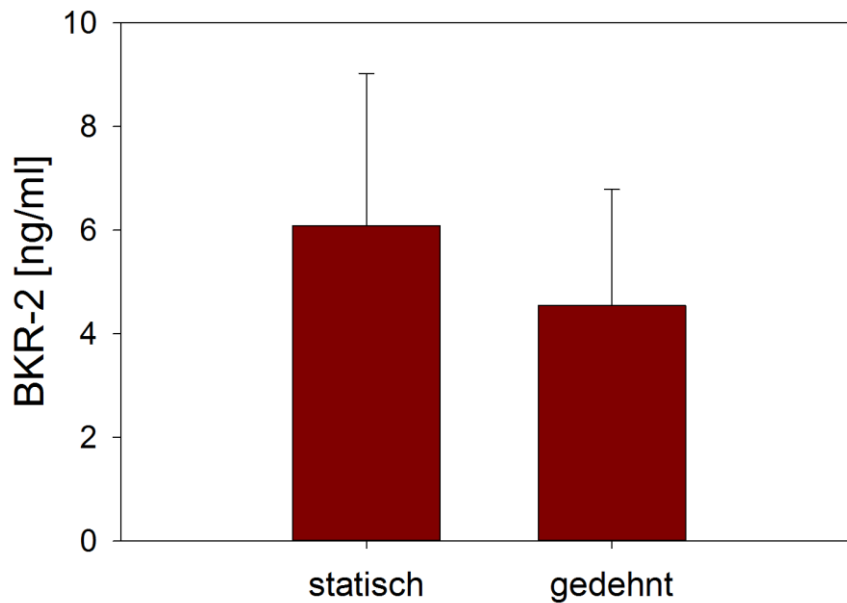
Die Konzentration des Bradykinin-Rezeptors 2 wurde mithilfe eines Sandwich-ELISAs bestimmt. Weder in den Lysaten noch in den Überständen konnte ein statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen statischen und gedehnten AT-II-Zellkulturen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Zyklische Überdehnung beeinflusst demnach weder die intrazelluläre noch die extrazelluläre Proteinkonzentration des Bradykinin-Rezeptors 2.

Abbildung 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der Messungen als Mittelwerte  $\pm$  SD (Standardabweichung). Die Konzentrationen in den Zelllysaten wurden zur Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe in Beziehung gesetzt und sind daher in „ng/mg“ (Nanogramm pro Milligramm Gesamtprotein) angegeben. Im Mittel lagen die Rezeptorkonzentrationen in den Lysaten statischer Zellen bei  $6,34 \pm 4,36$  ng/mg und in den Lysaten gedehnter Zellen bei  $5,94 \pm 2,52$  ng/mg. In den Überständen der Zellkulturen lagen die Mittelwerte bei  $6,08 \pm 2,94$  ng/ml (statisch) und  $4,03 \pm 2,25$  ng/ml (gedehnt).



**Abbildung 15: Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen.**

Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels ELISA die Konzentrationen des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen bestimmt. Die Konzentrationsveränderungen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant, da  $p > 0,05$  (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 7$ ).



**Abbildung 16: Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen**  
 Nach zyklischer Dehnung für 24 Stunden wurden mittels EIA die Konzentrationen des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen bestimmt. Die Konzentrationsveränderungen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant, da  $p > 0,05$  (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 5$ ).

## 4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse zeichnet sich für das Kinin-Kallikrein-System alveolärer Typ-II-Zellen der Ratte folgendes Bild ab: Zyklische Überdehnung *in vitro* bewirkt eine Konzentrations- bzw. Aktivitätserhöhung der Bradykinin-bildenden Komponenten, namentlich der Peptidvorstufe Kininogen 1 und der Serinprotease Kallikrein. Die Zunahme konnte sowohl in den Zelllysaten als auch extrazellulär in den Zellüberständen festgestellt werden. Daher hätte man annehmen können, dass Bradykinin vermehrt gebildet wird. Eine Konzentrationserhöhung des Bradykinins nach 24 Stunden zyklischer Dehnung ließ sich allerdings in den Überständen der gedehnten Zellen nicht feststellen. Stattdessen zeigte sich eine verringerte Bradykinin-Konzentration, die aber auf eine dehnungsinduzierte Steigerung der Bradykinin-abbauenden Aktivität im Extrazellulärraum zurückgeführt werden kann.

Auf den Bradykinin-Rezeptor 2 hatte zyklische Dehnung über 24 Stunden in den vorliegenden Versuchen keinen Effekt. Die Konzentrationen gedehnter und ungedehnter ATII-Zellen zeigten sowohl in den Lysaten als auch in den Überständen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *in vitro*-Modell die Wirkung zyklischer mechanischer Überdehnung auf das Bradykinin-bildende Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte untersucht. Dieses *in vitro*-Modell simuliert die beatmungsinduzierte beziehungsweise -assoziierte Lungenschädigung, wie sie bei ARDS-Patienten und anderen respiratorisch insuffizienten Intensivpatienten häufig auftritt. Bei einer solchen Lungenschädigung können die betroffenen Zellen durch den programmierten Zelltod zugrunde gehen (Hammerschmidt et al. 2004; Bardales et al. 1996; Edwards et al. 1999). Da zahlreiche Studien Hinweise auf zellprotektive anti-apoptotische Eigenschaften von Bradykinin liefern (Hammerschmidt et al. 2007; Yin et al. 2005; Xu et al. 2012), ist ein tieferes Verständnis der Wirkungen zyklischer Dehnung auf das Bradykinin-bildende Kinin-Kallikrein-System von großem Interesse. Im Hinblick auf die Entwicklung erfolgreicher Therapien beatmungspflichtiger Patienten leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Eröffnung neuer pharmakologischer Möglichkeiten.

### 5.1. Diskussion der Methoden

#### 5.1.1. Dehnexperiment

Die adäquate Simulation einer akuten Lungenschädigung am Zellmodell gestaltet sich grundsätzlich schwierig, da die ARDS-Lunge eine heterogene Struktur aufweist: Belüftete, kollabierte und flüssigkeitsgefüllte Areale existieren nebeneinander, sodass zusätzliche unberechenbare Kräfte entstehen, zum Beispiel Scherstress zwischen belüfteten und unbelüfteten Alveolen (Bilek et al. 2003; Kuchnicka und Maciejewski 2013). Durch den *baby lung effect* kann selbst ein kleines Tidalvolumen (in Bezug auf das errechnete Körpergewicht) mitunter sehr starke Dehnung bewirken (Gattinoni und Pesenti 2005). In den vorliegenden Versuchen wurden die Zellen jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum einer konstanten Dehnungsamplitude ausgesetzt. Schwankungen der Amplitude wie sie *in vivo* auftreten und eventuell hinzukommende Kräfte wie die genannte Scherung konnten im Modell nicht berücksichtigt werden.

Die *in vivo* auf die Lungenzellen wirkenden Kräfte sind eine Kombination aus verschiedenen physikalisch definierten Kräften: Dehnung (*strain* = Längenveränderung im Verhältnis zur Ausgangslänge), Spannung (*stress* = Kraft pro Flächeneinheit), Scherung (*shear stress* = Spannung, die parallel zur Ebene wirkt), Kompression (*compressive stress* = Kraft auf die Ebene zu) und Zugspannung (*tensile stress* = Kraft von der Ebene weg). Eine genaue Abbildung dieser Wirkungsverhältnisse gestaltet sich *in vitro* dementsprechend schwierig, weshalb in betreffenden Studien meist ungenau definierte Begriffe wie *stretch* (auf Deutsch ebenfalls „Dehnung“) oder Deformation gebraucht werden - im Versuch die Komplexität der wirkenden Kräfte zu verdeutlichen (Liu et al. 1999).

Liu et al. (1999) beschreiben in ihrem Review verschiedene Methoden der mechanischen Dehnung von Zellkulturen: statische und zyklische sowie uni- und biaxiale Dehnung, die mit positiven oder negativen Drücken erzeugt werden, sowie dreidimensionale Dehnung und Scherung über Grenzflächenreibung. Auch Berührung mit Mikropipetten und magnetisches Verdrehen der Zellen gehören zu den gängigen Methoden mechanischer Stimulation. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Dehnungssystem existiert in seiner Urform seit 1985 (Banes et al.). Die durch den Apparat auf die Zellen übertragene Dehnung lässt sich als nicht-planare, biaxiale, zyklische Verformung beschreiben (für eine genauere Beschreibung der Funktionsweise siehe Abschnitt 3.2.2.). Seit 1987 unter dem Namen Flexercell® kommerzialisiert, gehört der Apparat zu den am häufigsten verwendeten Dehnungssystemen und genießt in der Forschungsgemeinschaft hohe Akzeptanz (Brown 2000). Dennoch gab es in der Vergangenheit an der Methode einige Kritikpunkte: So stellten Gilbert et al. (1994) fest, dass die Zellen auf der damals 2 mm dicken Silikonmembran inhomogenen Kräften ausgesetzt waren: In der Peripherie wirkten die Dehnungskräfte viel stärker als im Zentrum der Membran. Daraufhin wurden die BioFlex®-Membranen in verbessertem Design mit 0,5 mm Dicke und einem vergrößerten Durchmesser produziert, wodurch sie sich dem idealen Membranverhalten weiter annäherten (Brown 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde zudem darauf geachtet, die Zellen zentral auf den Silikonmembranen zu kultivieren, wo die biaxialen Kräfte über die Membran konstant wirken (Vande Geest et al. 2004). Ein anderer Kritikpunkt stammt von Vlahakis et al. (1999), die feststellten, dass durch die Beschleunigung der Zellen auf der BioFlex®-Membran während der Dehnung gegenüber dem eher trägen Medium Scherkräfte an der apikalen Zellmembran



entstehen. Die Relevanz dieser Beobachtung ist jedoch bisher nicht geklärt. Vande Geest et al. (2004) schreiben diesen Scherkräften keine signifikanten Effekte zu.

In den vorliegenden Versuchen wurde über die Flexercell-Software ein Atemmuster mit der Frequenz 40/min und der Amplitude 30 % ausgewählt. Damit sollte die Überblähung der Lunge bei Ruheatemungsfrequenz simuliert werden. Zwar liegt die Ruheatmung der Ratte eigentlich bei einer Frequenz von 70-110/min (Fust und Hartmann 1961), aufgrund technischer Limitierung durch Überhitzung der Vakuumpumpe, Trägheit des Membranmaterials sowie des Rupturrisikos der BioFlex®-Membranen bei hochfrequenter Belastung musste jedoch näherungsweise eine Frequenz unterhalb der eigentlichen Ruheatmung gewählt werden. Die Amplitude von 30 % orientiert sich an den Ergebnissen von Tschumperlin und Margulies (1999), die am Rattenmodell die Oberflächenveränderung der alveolären Basalmembran während der Atmung untersuchten. Eine Oberflächenvergrößerung von 7-15 % entspricht demnach der Inspiration bei Ruheatmung (40 - 70 % der totalen Lungenkapazität), wohingegen eine Oberflächenvergrößerung von 30 - 35 % einer kompletten Inflation der Lunge (100 % der totalen Lungenkapazität) entspricht. Da die alveolären Epithelzellen der Basalmembran direkt aufsitzen, sind diese Erkenntnisse direkt übertragbar, jedoch mit der Einschränkung, dass AT-II-Zellen durch ihre Lokalisation in den Ecken der Alveolen eventuell geringerer Verformung ausgesetzt sind als Typ-I-Zellen, die die Alveolarsepten besiedeln (Perlman und Bhattacharya 2007). Eine Überblähung in der Dimension von 100 % der totalen Lungenkapazität ist in vivo in inhomogen geschädigten Lungen selbst während einer protektiven Beatmung durchaus realistisch; möglicherweise kann sie sogar noch übertroffen werden, um eine ausreichende Oxygenierung des Patienten zu sichern.

Die Versuchsdauer von 24 Stunden wurde gewählt, um die Auswirkung relativ langfristiger mechanischer Belastung zu untersuchen, wie sie auch bei beatmeten ARDS-Patienten vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das vorliegende Zelldehnungsmodell trotz seiner Limitierungen sowohl in der Art der Zelldeformation als auch im gewählten Dehnungsprotokoll die Verhältnisse der akuten Lungenschädigung näherungsweise wiederzugeben vermag.

### 5.1.2. Zellkultur

Für die Zellkultur wurden alveoläre Typ-II-Zellen aus der männlichen Sprague-Dawley-Ratte isoliert. Bei nicht-humanen Zellkulturen besteht immer die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Zwar sind in der Literatur auch Zellkulturen humaner alveolärer Typ-II-Zellen beschrieben (Alcorn et al. 1997; Elbert et al. 1999; Gonzalez et al. 2010), jedoch ist in der vorliegenden Arbeit die Entscheidung aus logistischen und methodischen Gründen für das Modell der Typ-II-Zellkultur der Ratte gefallen. Trotz der geringen Verfügbarkeit humanen Lungengewebes und der zelltechnischen Schwierigkeiten bei der Isolation und Kultivierung humaner alveolärer Epithelzellen unternahmen Davidovich et al. (2013) die Anstrengung, eine Methode für *in vitro*-Dehnungsstudien an humanem alveolären Epithel zu entwickeln, die von Erfolg gekrönt war. Jedoch wiesen die humanen alveolären Epithelzellen im Vergleich zu denen der Ratte offenbar schlechtere Konfluenz auf, sodass sich schon nach 60-minütiger Dehnung mit hoher Amplitude deutliche Lücken zwischen den Zellen entwickelten und sie sich teilweise von der Dehnmembran ablösten. Im Gegensatz dazu ist die Methodik des Dehnungsmodells der vorliegenden Arbeit mit alveolären Epithelzellen der Ratte seit längerem etabliert (Dobbs et al. 1986) und genießt weitgehende Anerkennung. Die über die Jahre hinweg häufige Anwendung trug zur ihrer technischen Optimierung bei, sodass beispielsweise die Dehnung der Zellen über 24 Stunden ohne nennenswerte Ablösung von der Dehnmembran möglich ist.

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1. Die Beeinflussung der Bradykinin-Konzentration durch zyklische mechanische Dehnung

In der vorliegenden *in vitro*-Studie an alveolären Typ-II-Zellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass zyklische mechanische Dehnung mit hoher Amplitude über 24 Stunden einen signifikanten Konzentrationsabfall des extrazellulären Bradykinins bewirkt.

Ebenfalls einen Rückgang der Bradykinin-Konzentration als Reaktion alveolärer Typ-II-Zellen auf zyklische Überdehnung stellten Hammerschmidt et al. (2007) fest: Bei identischem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit wurde eine um 25 % niedrigere Bradykinin-

Konzentration in den Überständen gedehnter Zellen im Vergleich zu ungedehnten Kontrollen gemessen. Die Autoren interpretierten dieses Ergebnis als Indiz für eine durch Dehnung beeinträchtigte Freisetzung von Bradykinin. In der vorliegenden Arbeit konnte die Abnahme der Bradykinin-Konzentration nicht nur repliziert, sondern auch in einem größeren Ausmaß festgestellt werden: Sie verringerte sich um knapp die Hälfte (48 %), während Hammerschmidt und Kollegen eine Abnahme um lediglich ein Viertel nachweisen konnten.

Wösten-van Asperen et al. (2008) hingegen stellten bei einem *in vivo* Experiment an der Rattenlunge eine dehnungsinduzierte Zunahme der Bradykinin-Konzentration fest. Die Konzentrationszunahme korrelierte dabei positiv mit der Größe der Dehnungsamplitude. Der Versuchsaufbau war jedoch grundlegend verschieden: Die Tiere wurden *in vivo* für einen kürzeren Zeitraum (vier Stunden) mit unterschiedlich hohen Amplituden mechanisch beatmet und die Bradykinin-Bestimmung erfolgte in Flüssigkeit aus der bronchoalveolären Lavage (BAL). Der Bradykinin-Gehalt in der BAL Flüssigkeit kann jedoch von zahlreichen anderen Zellen, nicht nur von AT-II-Zellen beeinflusst werden. Zudem wäre bei dem *in vivo* Experiment auch ein Übertritt des Bradykinins aus anderen Kompartimenten, zum Beispiel aus dem Gefäßkompartiment (Endothelzellen, Blutplasma) nach beatmungsbedingter Schädigung der Blut-Gas-Barriere möglich. Da sich somit keine exakte Aussage über die Herkunft des Bradykinins treffen lässt, steht dieses Ergebnis der beatmungsbedingten Erhöhung der Bradykinin-Konzentration auch nicht in direktem Gegensatz zu dem der vorliegenden Arbeit, die ausschließlich alveoläre Typ-II-Zellen bezüglich ihrer Bradykinin-Konzentration fokussiert.

Die Beeinflussung der Bradykinin-Konzentration durch mechanische Dehnung wurde auch an extrapulmonalem Gewebe untersucht. Beispielsweise führten Wei et al. (2003) *in vivo* Bestimmungen der Bradykinin-Konzentration in kardialer interstitieller Flüssigkeit durch, nachdem in adulten Sprague-Dawley-Ratten durch eine operativ geschaffene aortokavale Fistel eine akute kardiale Volumenüberlastung kreiert worden war. Die Bradykinin Konzentration der interstitiellen Flüssigkeit stieg auf diese mechanische Reizung des Myokards hin signifikant an. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte den Bradykinin-Anstieg auch an isolierten Kardiomyozyten der adulten Ratte in einem *in vitro*-Dehnexperiment zur KKS-Aktivierung bestätigen (Wei et al. 2012), siehe auch Abschnitt 5.2.2.. Eine mögliche Erklärung für diesen Bradykinin-Anstieg ist, dass die Bradykinin-abbauende Aktivität in kardialem

Gewebe durch akute mechanische Belastung weniger stark gesteigert wird als in pulmonalem Gewebe. Tatsächlich konnten Wei und Kollegen bei ihren Untersuchungen in vivo (2003 und 2012) in den ersten Tagen und Wochen nach Kreation der aortokavalen Fistel keinen signifikanten Anstieg der ACE-Aktivität feststellen.

### 5.2.2. Die Beeinflussung der Bradykinin-bildenden Komponenten durch zyklische mechanische Dehnung

Die Frage nach den Ursachen des Bradykinin-Konzentrationsabfalls führt zur ersten Hypothese der vorliegenden Arbeit:

***„Die Bradykinin-Konzentration sinkt, weil die Bradykinin-Produktion in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte durch zyklische mechanische Überdehnung beeinträchtigt wird.“***

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben jedoch eine Steigerung der Bradykinin-bildenden Komponenten des Kinin-Kallikrein-Systems: Sowohl das Bradykinin-Vorläuferprotein Kininogen 1 als auch die Serinprotease Kallikrein, die aus Kininogen das aktive Peptid Bradykinin freisetzt, zeigen intra- und extrazellulär eine deutliche Erhöhung der Proteinkonzentration bzw. der Enzymaktivität im Vergleich zu ungedehnten Kontrollen.

Zyklische mechanische Stimulation mit hoher Amplitude führt also in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte zu vermehrter Produktion und Freisetzung von Kininogen 1.

Eine Studie von Takano et al.(2000) beschäftigte sich mit der gewebespezifischen Expression von Kininogenen bei Ratten und stellte fest, dass *low* und *high molecular weight* Kininogen in verschiedenen Geweben wie Lunge, Niere und Haut, nicht nur unterschiedlich stark exprimiert werden, sondern dass auch das Mengenverhältnis zueinander variiert. Da die beiden Kininogene durch dasselbe Gen codiert werden, lässt sich daraus schließen, dass die Expression durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen einer gewebespezifischen Regulation unterliegt. Eine gewebespezifische Regulation der Kininogen-Expression stellten auch Okamoto et al. (1996) fest, die Kininogen mRNA in humanen und Ratten Fibroblasten nachwiesen und als Reaktion auf einen akuten Entzündungsreiz in vivo beziehungsweise durch Stimulation mit Prostaglandin E2 *in vitro* eine verstärkte Kininogen-Expression in Fibroblasten beobachten konnten.

Hammerschmidt et al. (2005) zeigten in ihrem *in vitro*-Dehnungsexperiment, dass zyklische mechanische Überdehnung in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte das Gleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren in Richtung der pro-inflammatorischen Mediatoren verschiebt und insbesondere die Genexpression der Cyclooxygenase 2 verstärkt. Dieses Enzym ist unter anderem an der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese beteiligt und Prostaglandin E<sub>2</sub> wurde wiederum die Fähigkeit nachgewiesen, die Kininogen-Expression zu stimulieren. Diese Zusammenhänge bieten eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Kininogen-Proteinkonzentration in AT-II-Zellen nach zyklischer mechanischer Überdehnung.

Ebenfalls stimulierend wirkte der zyklische Dehnungsreiz in den vorliegenden Experimenten auf die Kallikrein-Aktivität, die sowohl intra- als auch extrazellulär nach 24stündiger Dehnung deutlich erhöht gemessen wurde.

Bei der hier durchgeführten Kallikrein-Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenzspektroskopie kann nicht zwischen Plasma- und Gewebe-Kallikrein unterschieden werden, da beide Enzyme das fluoreszierende MCA freisetzen. Zwar wird das Gewebe-Kallikrein (t-Kallikrein) als das in der Lunge vorherrschende Kallikrein angesehen, da es in großer Menge produziert wird (Kaplan et al. 2002), jedoch konnte t-Kallikrein im Respirationstrakt bisher nur in den seromukösen Drüsenzellen der Atemwege lokalisiert werden, namentlich in der Nasenschleimhaut (Baumgarten et al. 1989; Poblete et al. 1993), in der Trachea und in den extra- und intrapulmonalen Bronchien, wohingegen die immunhistochemische Anfärbung von t-Kallikrein in den Bronchiolen, Alveolargängen und in den Alveolen bisher nicht gelang (Poblete et al. 1993). O'Riordan et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie die t-Kallikrein-Aktivität im Sputum aus den unteren Atemwegen bei kurzfristig (< eine Woche) mechanisch ventilierten Patienten und langfristig (> vier Wochen) ventilierten Patienten mit beziehungsweise ohne beatmungsassoziierte Tracheobronchitis. Ihre Ergebnisse zeigen eine deutliche Erhöhung der t-Kallikrein-Aktivität im Sputum von Patienten mit langfristiger mechanischer Beatmung und Atemwegsentszündung gegenüber kurzzeitig beatmeten Patienten ohne Entzündung der Atemwege. Dies kann bedeuten, dass t-Kallikrein selbst oder via Kinin-Produktion entzündungsmodulierende Effekte bewirkt, und es kann auch bedeuten, dass die t-Kallikrein-Aktivität mechanisch beeinflussbarer Regulation unterliegt, was die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen würde.

Plasma-Kallikrein (p-Kallikrein) Genexpression findet zum größten Teil in Leber, Pankreas und Nieren statt, wurde aber auch in diversen anderen Geweben, z.B. in Lunge, Herz, Haut, Kolon, Ovarien und Testes, und in ubiquitären Zellen (Leukozyten) nachgewiesen (Neth et al. 2001). Fink et al. (2007) zeigten, dass diese Genexpression in allen untersuchten Geweben auch in Proteinsynthese von Plasma-Prekallikrein (PPK) mündet, dem Vorläufer des aktiven p-Kallikreins. Mittels immunhistochemischer Anfärbung zeigten sie insbesondere in respiratorischen Epithelzellen in Trachea, Bronchien und Bronchiolen signifikante PPK-Synthese, obwohl die mRNA-Expression in diesen Zellen in nur sehr geringem Maße stattfindet (Neth et al. 2001). Die Tatsache, dass PPK auch auf der Zellkernmembran der Epithelzellen gefunden wurde, liefert den Hinweis, dass es an der Regulation von zytoplasmatischen und nukleären Funktionen beteiligt sein könnte (Fink et al. 2007).

In einer Studie von Varano della Vergiliana et al. (2010) wurde die Aktivierung von PPK zu Plasma-Kallikrein auf respiratorischen Epithelzellen untersucht, unter anderem auf Zellen einer transformierten Tumorzelllinie (A549-Zellen), die als Modell humaner AT-II-Zellen eingesetzt werden. Übereinstimmend mit den Erkenntnissen über die PPK-Aktivierung auf Endothelzellen (Rojkjaer und Schmaier 1999) fand man auch auf A549-Zellen die Expression von Multiprotein-Rezeptoren, die den Komplex aus HMWK und PPK zinkabhängig binden. Eine Inkubation der A549-Zellen mit PPK und HMWK führte zur signifikanten Erhöhung der Menge an Bradykinin, was für eine Aktivierung von PPK zu Plasma-Kallikrein spricht. Auf kolorektalen und prostaticen Epithelzellen ließen sich die Ergebnisse replizieren, was die Autoren zu der Annahme bewegte, dass Epithelzellen generell zur Aktivierung des Plasma Kallikrein-Kinin-Systems befähigt sind (Varano della Vergiliana et al. 2010).

Man kann also festhalten, dass in der Lunge sowohl Gewebe- als auch Plasma-Kallikrein vorhanden sind und aktiviert werden können. Somit können beide Unterformen in dem vorliegenden Dehnungsmodell alveolärer Typ-II-Zellen eine Rolle spielen. Beide Enzyme führen letztendlich zur Bradykinin-Bildung, Plasma-Kallikrein auf direktem Weg und Gewebe-Kallikrein über das Zwischenprodukt Lys-Bradykinin/Kallidin (beziehungsweise bei der Ratte *Kallidin like Peptide*), das durch eine Aminopeptidase einfach in Bradykinin umgewandelt werden kann. Die durchgeführten Aktivitätsmessungen unterscheiden nicht zwischen den Kallikrein-Unterformen und beziehen sich auf die Gesamt-Kallikrein-Aktivität.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen sind die Untersuchungen von Hammerschmidt et al. (2007) zu sehen. Bei identischem experimentellen Aufbau und dem Einsatz der gleichen Zellart kamen sie zu folgenden Ergebnissen: Dehnung mit hoher Amplitude führt zu einem starken Anstieg der Kallikrein-Aktivität in den Zellüberständen bei gleichzeitigem deutlichen Rückgang (55 %) der Genexpression von T-Kininogen. Während der Anstieg der Kallikrein-Aktivität mit den vorliegenden Ergebnissen offensichtlich übereinstimmt, lassen sich die Ergebnisse für Kininogen scheinbar nicht miteinander vereinbaren. Es muss jedoch beachtet werden, dass zwei verschiedene Kininogene untersucht wurden: In der vorliegenden Studie wurde die Proteinkonzentration von Kininogen 1 bestimmt, in der von Hammerschmidt und Kollegen handelt es sich um die Genexpression des nur bei Ratten existierenden T-Kininogens. Dabei wurde angenommen, dass T-Kininogen der Bradykinin-Vorläufer der Ratte ist und von Kallikrein proteolysiert wird. Diese Annahme trifft jedoch nicht zu, da T-Kininogen für Kallikrein nicht empfänglich ist und daraus zudem kein Bradykinin, sondern T-Kinin entsteht (siehe auch Abschnitt 1.4.).

Die Reagibilität der Bradykinin-bildenden Komponenten des KKS auf mechanische Stimulation wurde auch an anderen Geweben gezeigt: Yayama et al. (2001) führte eine *in vivo* Studie zu deren Genexpression in mechanisch belasteten Kardiomyozyten von Mäusen durch. Bei den Versuchstieren wurde operativ eine Aortenkonstriktion verursacht, wodurch sich nach 14 Tagen eine manifeste Herzhypertrophie durch Druck(über)belastung des Myokards entwickelte. Die Bestimmung von LMWK und Gewebe-Kallikrein mRNA in den Kardiomyozyten zeigte eine verstärkte Genexpression parallel zur Entwicklung der Hypertrophie. Bei den Kontrolltieren wurde eine Placebo-Operation durchgeführt, in deren Folge sich die Genexpression nicht signifikant veränderte.

Bestätigt werden diese *in vivo* Experimente von den Ergebnissen einer von Wei et al. (2012) durchgeführten *in vitro*-Studie an Kardiomyozyten der Ratte: Isolierte Kardiomyozyten der adulten Sprague-Dawley-Ratte wurden hier - vergleichbar mit dem experimentellen Aufbau der vorliegenden Arbeit - ebenfalls in einer Flexercell-Apparatur für 24 Stunden zyklisch gedehnt (Amplitude 5%). Daraufhin wurde eine erhöhte Expression von tissue-Kallikrein und B<sub>2</sub>-Rezeptor mRNA in den Kardiomyozyten festgestellt und mittels Radioimmunessay eine

Versechsfachung der Bradykinin Freisetzung gemessen. Auch diese Ergebnisse sprechen eindeutig für eine dehnungsinduzierte Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems.

Die erste der untersuchten Arbeitshypothesen, die beinhaltet, dass zyklische Dehnung die Bradykinin-Produktion beeinträchtigt, muss also verworfen werden, da die Bradykinin-bildenden Komponenten Kallikrein und Kininogen 1 dehnungsinduziert verstärkt aktiviert bzw. vermehrt gebildet werden.

### 5.2.3. Die Beeinflussung des Bradykinin-Abbaus durch zyklische mechanische Dehnung

Die Bradykinin-Konzentration spiegelt das Zusammenspiel aus BK-bildenden und BK-abbauenden Komponenten des KKS wieder. Da bei der Bradykinin-Bildung in AT-II-Zellen dehnungsinduziert eine eindeutige Zunahme registriert werden konnte, die Bradykinin-Konzentration aber dennoch vermindert gemessen wurde, liegt der Rückschluss auf eine starke Bradykinin-abbauende Aktivität nahe, was zur zweiten Hypothese der vorliegenden Arbeit führt:

***„Die Bradykinin-Konzentration sinkt, weil zyklische mechanische Dehnung von alveolären Typ-II-Zellen der Ratte die Bradykinin-abbauende Aktivität steigert.“***

Diese Hypothese ließ sich experimentell bestätigen: Im Vergleich zu statischen Kontrollen konnte in den Überständen der gedehnten AT-II-Zellkulturen ein starker Anstieg der Bradykinin-abbauenden Aktivität festgestellt werden.

Der Bradykinin-Abbau erfolgt hauptsächlich durch vier Enzyme, namentlich durch die Carboxypeptidase M (CPM) und Carboxypeptidase N (CPN), das *Angiotensin converting Enzyme* (ACE) und die Neutrale Endopeptidase (NEP). Die Carboxypeptidasen werden auch als Kininasen Typ I bezeichnet, während ACE auch unter dem Namen Kininase II läuft.

- Die **Carboxypeptidase N (CPN)** wird in Hepatozyten synthetisiert und ins Blut sezerniert, wo sie die Aktivität von zirkulierendem Bradykinin, Wachstumsfaktoren,



Zytokinen und Anaphylatoxinen reguliert (Keil et al. 2007). Am Bradykinin-Abbau alveolärer Epithelzellen ist sie unbeteiligt.

- Die **Carboxypeptidase M (CPM)** ist ein membranständiges Enzym und kommt in verschiedensten Geweben vor, beispielsweise in Lunge, Herz, Niere, Plazenta, auf Endothelzellen und Fibroblasten. Sie inaktiviert Bradykinin, indem sie die Aminosäure Arginin am Carboxylende entfernt, wodurch Bradykinin zu des-[Arg]-Bradykinin wird, das als spezifischer Agonist am Bradykinin-Rezeptor B<sub>1</sub> wirkt (Kashuba et al. 2013). Eine Studie von Nagae et al. (1993) zeigte zwar in der Lunge verglichen mit anderen Organen eine besonders hohe Konzentration an CPM, konnte das Enzym aber nur auf alveolären Typ-I-Zellen und Makrophagen lokalisieren; auf AT-II-Zellen war es immunhistochemisch nicht nachweisbar.
- Die **Neutrale Endopeptidase (NEP)** ist eine membrangebundene Metalloprotease, die auf zahlreichen Geweben exprimiert wird (Kokkonen et al. 2000). In der gesunden Lunge konnte sie auf respiratorischem und alveolärem Epithel sowie auf Fibroblasten nachgewiesen werden (Cohen et al. 1996). Neben Bradykinin fungieren noch zahlreiche andere Peptide als Substrate, zum Beispiel Angiotensin I und II, Substanz P, Endothelin, Enkephalin und  $\beta$ -Amyloid, die die NEP am Aminoterminus hydrophober Aminosäuren abbaut (Kashuba et al. 2013). Die NEP schneidet die Bradykinin-Nonapeptidsequenz simultan an den Positionen 7-8 und 4-5, sodass zwei inaktive Bradykinin-Fragmente entstehen (Ramirez-Molina et al. 2006).
- Das **Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)**, auch Kininase II genannt, wird ebenfalls membrangebunden synthetisiert, kann aber über post-translationale Modifikation den Membrananker verlieren und so in die Zirkulation gelangen. Demnach befindet es sich sowohl in Plasma und Körperflüssigkeiten wie Urin, Liquor und Fruchtwasser, als auch auf Membranen von Makrophagen, T-Lymphozyten, Keimzellen, Nervenzellen, Endothel- und Epithelzellen (Costerousse et al. 1993; Kashuba et al. 2013). Namensgebend ist seine Funktion im blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), in dem es Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt. ACE besitzt zwei katalytische Abschnitte, die C-Domäne und die N-Domäne, die beide sowohl in der löslichen als auch in der membranständigen Enzymform vorhanden sind, jedoch verschiedene chemische und enzymatische

Eigenschaften aufweisen: Die Umwandlung von Angiotensin I zu II findet beispielsweise hauptsächlich an der C-Domäne statt, während der Bradykinin-Abbau in gleicher Weise an beiden Domänen betrieben wird (Bernstein et al. 2011). ACE schneidet, der NEP ähnlich, die Bradykinin-Peptidsequenz an zwei Stellen, an Position 5-6 und ebenfalls an Position 7-8 (Ramirez-Molina et al. 2006). Die entstehenden Fragmente sind inaktiv.

Für den BK-Abbau alveolärer Typ-II-Zellen *in vivo* sind also hauptsächlich ACE und NEP verantwortlich. Ramirez-Molina et al. (2006) bestätigen dies an isolierten Membranen aus Lungengewebe der Ratte und bewiesen darüber hinaus, dass die Metabolisierung von Bradykinin durch ACE und NEP zu gleichen Anteilen bewältigt wird. Die beiden Enzyme arbeiten synergistisch und beeinflussen sich gegenseitig, wie eine Studie zum Bradykinin-Metabolismus in der Rattenlunge von Dragovic et al. (1993) herausfand: Sie bestimmten die Bradykinin-Konzentration in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit nach kombinierter bzw. einfacher Hemmung der Bradykinin-abbauenden Enzyme und stellten fest, dass nur die gleichzeitige Hemmung beider Enzyme zu einem Anstieg der Bradykinin-vermittelten Effekte führte, nicht aber die Hemmung eines der beiden Enzyme allein. Offenbar kompensieren ACE und NEP den Ausfall des jeweils anderen synergistisch wirkenden Enzyms mit gesteigerter abbauender Aktivität. Zu diesem Schluss kamen auch Graf et al. (1993) bei der Untersuchung des Abbaus endogenen vasoaktiven Bradykinins durch die NEP auf humanen Endothelzellen der Umbilikalvene: Bei ACE-Hemmung kam es zu einer Steigerung der NEP-Aktivität.

Die vorliegende Untersuchung zur Bradykinin-abbauenden Aktivität wurde *in vitro* in Überständen von AT-II-Zellkulturen nach einer Dehnung von 24 Stunden durchgeführt. Exogenes Bradykinin wurde beigelegt und dessen Abbau mit dem Abbau in Überständen ungedehnter AT-II-Zellkulturen verglichen. Während in letzteren nach der zweistündigen Inkubation etwa die Hälfte des vorhandenen Bradykinins abgebaut war, wurde in den Überständen gedehnter AT-II-Zellen über 70% des hinzugefügten Bradykinins abgebaut. Da der BK-Abbau durch die NEP ausschließlich membrangebunden stattfindet, die vorliegende Untersuchung aber in den Überständen der Zellkulturen durchgeführt wurde, spielt die NEP bei der gemessenen Steigerung Bradykinin-abbauender Aktivität wenn überhaupt eine untergeordnete Rolle, etwa durch aus geschädigten Zellen frei gewordene Enzyme.

Ich möchte daher im Folgenden vor allem auf den dehnungsinduzierten Bradykinin-Abbau durch das Angiotensin-konvertierende Enzym eingehen.

In der bereits mehrfach erwähnten Studie von Hammerschmidt et al.(2007) wurde durch Überdehnung ein Rückgang der Bradykinin-Konzentration registriert. Dieser Rückgang konnte durch die Zugabe des ACE-Hemmers Captopril vollständig verhindert werden. In statischen Zellkulturen hingegen führte die Hemmung des Bradykinin-Abbaus durch Captopril nicht zur Erhöhung der Bradykinin-Konzentration. In Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen bedeutet das, dass die verstärkte dehnungsinduzierte abbauende Aktivität hauptsächlich durch ACE geleistet wird. Dass Captopril unter statischen Bedingungen hingegen keinen Effekt auf die Bradykinin-Konzentration hat, bekräftigt die vorliegenden Ergebnisse weiterhin, denn in statischen Zellkulturen wird weder die Bradykinin-Bildung noch dessen Abbau mechanisch stimuliert, sodass die Hemmung des konstitutiven Bradykinin-Abbaus bei der ebenfalls geringeren konstitutiven Bradykinin-Bildung in den statischen Zellkulturen keinen signifikanten Effekt hervorruft.

Studien in verschiedenen extrapulmonalen Geweben liefern weitere Belege für die kausalen Zusammenhänge zwischen dem Einwirken mechanischer Kraft und gesteigerter Expression und Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms:

In ihrem Modell ventrikulärer Hypertrophie kultivierten Liang und Gardner (1998) Kardiomyozyten neugeborener Ratten und setzten sie für 48 Stunden zyklischer Dehnung mit hoher Amplitude aus. Die Genexpression von ACE mRNA stieg zunächst kontinuierlich an, erreichte nach 12 Stunden ihren Höhepunkt und blieb bis zur Messung nach 24 Stunden konstant erhöht. Zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 48 Stunden zyklischer Dehnung war die ACE Genexpression bereits wieder stark zurückgegangen. Ebenfalls an neonatalen Kardiomyozyten der Ratte führten Malhotra et al. (1999) ihre *in vitro*-Versuche durch. Die Zellkultur wurde auf einer Silikonmembran uniaxial für acht, 16 und 24 Stunden einer 20 prozentigen Dehnung ausgesetzt. Anschließende Untersuchungen ergaben einen zweifachen Anstieg der ACE-Genexpression nach 16 Stunden und einen vierfachen Anstieg nach 24 Stunden Dehnung. Die ACE-Aktivität war nach 24 Stunden Dehnung ebenfalls zweifach erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen diejenigen der *in vivo*-Studie von Schunkert et al.(1990) zur links-ventrikulären Hypertrophie durch mechanische Drucküberlastung in adulten Ratten, die operativ durch eine Aortenstenose induziert wurde. Die Kontrollgruppe

wurde einer Placebo-Operation unterzogen. Schunkert und Kollegen quantifizierten sowohl die Umwandlungsrate von Angiotensin I zu II durch ACE am schlagenden Herzen als auch die ACE-Aktivität in homogenisiertem links-ventrikulären Gewebe und stellten dabei jeweils eine deutliche Aktivitätssteigerung durch die druckbedingten mechanischen Reize auf das Myokard fest. Rechtsventrikuläres Gewebe, das keiner Überlastung ausgesetzt war, wies hingegen weder in der Gruppe mit Aortenstenose noch in der Kontrollgruppe eine ACE-Aktivitätssteigerung auf. Die ACE mRNA Expression in linksventrikulärem Gewebe war gegenüber linksventrikulärem Gewebe der Kontrollgruppe mehr als vierfach erhöht.

Hu et al. (2014) bewiesen in ihrer *in vitro*-Studie an glatten Muskelzellen aus der humanen Aorta, dass zyklische Dehnung mit einer Amplitude von 16%, wie sie etwa in vivo bei Hypertension entstehen kann, nach zwölf Stunden zu einer erhöhten ACE mRNA Expression und ACE-Proteinexpression führt. Die Autoren schlussfolgern aus diesen Ergebnissen in Zusammenschau mit Studien über die supprimierende Wirkung pulsatilen Scherstress auf die ACE-Expression und -Aktivität in kultivierten Endothelzellen (Barauna et al. 2011; Rieder et al. 1997), dass das ACE-kodierende Gen mechanosensibel ist.

Der vermehrte Bradykinin-Abbau, der in den vorliegenden Versuchen festgestellt wurde, geht demnach höchstwahrscheinlich auf erhöhte ACE-Expression in AT-II-Zellen und vermehrte Aktivität des freigesetzten ACE zurück. Damit kann die zweite Hypothese, dass das dehnungsbedingte Absinken der Bradykinin-Konzentration in den Überständen der AT-II-Zellkulturen auf vermehrte abbauende Aktivität zurückzuführen ist, bestätigt werden.

#### 5.2.4. Die Beeinflussung des Bradykinin-Rezeptors 2 durch zyklische mechanische Dehnung

Die Konzentration des Bradykinin-Rezeptors 2 (im Folgenden auch BKR2) wurde im Hinblick auf die dritte Arbeitshypothese untersucht:

***„Die Konzentration des freien Bradykinins sinkt ab, weil Bradykinin durch eine dehnungsinduzierte BKR2-Konzentrationserhöhung vermehrt rezeptorgebunden vorliegt.“***

Eine derartige Veränderung der Rezeptorkonzentration konnte in den vorliegenden Experimenten weder extra- noch intrazellulär nachgewiesen werden, da sich die

gemessenen Konzentrationsunterschiede zwischen gedehnten und ungedehnten AT-II-Zellkulturen als statistisch insignifikant erwiesen.

Hammerschmidt et al. (2007) fanden eine dehnungsbedingte Hochregulierung der BKR2-Genexpression, die sie als kompensatorische Reaktion auf das Absinken der Agonistenkonzentration interpretierten. Der erhöhten Genexpression entsprechende Ergebnisse auf Proteinebene konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt werden.

Vergleichbare Studien, die sich mit dem Einfluss zyklischer Dehnung auf den B<sub>2</sub>-Rezeptor beschäftigen sind rar. Außer der bereits genannten Studie von Hammerschmidt et al. (2007) gibt es meiner Kenntnis nach keine weiteren Untersuchungen, die sich auf alveoläre Typ-II-Zellen beziehen. In extrapulmonalem Gewebe jedoch, insbesondere in Kardiomyozyten, ist die mechanische Beeinflussung des Bradykinin-Rezeptors 2 Gegenstand der experimentellen Forschung.

Yayama und Kollegen führten an Mäusen (2001) und Ratten (2003) *in vivo* Versuche zur Rolle des KKS in Kardiomyozyten bei der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie durch. Nach der operativen Erzeugung einer Aortenkonstriktion an den Versuchstieren, die nach sieben Tagen durch Druckbelastung zu einer linksventrikulären Hypertrophie führte, wurde die Expression des B<sub>2</sub>-Rezeptors beobachtet. In beiden Spezies konnte schon ab dem zweiten Tag ein vorübergehendes Absinken der BKR2 mRNA Expression festgestellt werden, die sich nach zwei Wochen wieder normalisierte und sich denen der placebo-operierten Tiere anglich. In Kardiomyozyten der Ratte war die Rezeptorendichte deutlich reduziert, wohingegen die Rezeptoraffinität unbeeinflusst blieb. Diese Veränderungen konnten nur in linksventrikulären Kardiomyozyten festgestellt werden, die durch die Aortenkonstriktion besonders hoher mechanischer Belastung ausgesetzt waren. In rechtsventrikulären Kardiomyozyten blieb der B<sub>2</sub>-Rezeptor gänzlich unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu fanden Wei et al. (2012) in ihrem bereits erwähnten (Abschnitt 5.2.2.) *in vitro*-Experiment, in dem sie Kardiomyozyten der Ratte für 24 Stunden zyklischer Dehnung aussetzten, eine mehr als zweifache Steigerung der BKR2 mRNA Expression.

Möglicherweise unterliegt die Expression des B<sub>2</sub>-Rezeptors einer sehr fein differenzierten Regulation, die unter anderem von der Qualität des mechanischen Reizes abhängen könnte:

Mechanische Druckbelastung führt wie beschrieben zu verminderter Expression, während Dehnbelastung in Kardiomyozyten eine vermehrte Expression nach sich zieht.

Besser untersucht als der Einfluss zyklischer Dehnung auf den BKR2 ist hingegen sein Verhalten nach Agonistenstimulation. Dies ist auch für das vorliegende *in vitro*-Experiment relevant, da das dehnungsbedingt vermehrt gebildete Bradykinin eine hohe Spezifität für den B<sub>2</sub>-Rezeptor aufweist.

Die Reaktion des BKR2 auf Agonistenstimulation wurde in der Lunge in verschiedenen Zellen untersucht und ergab gegensätzliche Ergebnisse. In adulten Myofibroblasten und fetalen humanen Fibroblasten führt Bradykinin zu einer verminderten mRNA Expression und einem dramatischen Rückgang (90 %) der Rezeptorenzahl auf der Membranoberfläche aufgrund von Rezeptorinternalisierung (Phagoo et al. 1999; Bengtson et al. 2008). In humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B-Zellen) hingegen führte Bradykinin zu einer signifikant gesteigerten BKR2 mRNA Expression (Ricciardolo, Fabio L M et al. 2012), einer dichteren Rezeptorenbesetzung der Zellmembran und einer verbesserten mRNA Stabilität (Bengtson et al. 2008).

Hecquet et al. (2000) identifizierten einen weiteren direkten Agonisten am BKR2, nämlich humanes Kallikrein, das den B<sub>2</sub>-Rezeptor unmittelbar und unabhängig von enzymatischer Bradykinin-Freisetzung aktivieren kann. Ihre Versuche führten Hecquet und Kollegen an Hamster-Ovarialzellen durch, die sie so transfizierten, dass sie humanen BKR2 exprimierten. Es gelang ihnen, an diesen Zellen zu zeigen, dass eine direkte Aktivierung durch Kallikrein - anders als die Aktivierung durch Bradykinin - nicht zur Rezeptorinternalisierung führt, sondern im Gegenteil zur zügigen Redistribution des BKR2 auf der Zellmembran (Hecquet et al. 2002).

Studien zur Regulation des B<sub>2</sub>-Rezeptors nach Agonistenstimulation speziell auf alveolärem Epithel sind meines Wissens bisher nicht veröffentlicht. In den vorliegenden Versuchen konnte durch zyklische Dehnung für 24 Stunden auch intrazellulär kein signifikanter Konzentrationsunterschied des BKR2 zwischen gedehnten und statischen Zellen hervorgerufen werden. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass keine vermehrte Rezeptorinternalisierung stattfindet. Eine mögliche Interpretation wäre, dass der dehnungsbedingt schnellere Abbau des Bradykinins die Internalisierung vermindert.

Möglicherweise überlagern sich aber während der Dehnungsperiode auch mehrere Effekte, die mit nur einer Konzentrationsbestimmung nach 24 Stunden nicht nachzuvollziehen sind: So könnte Bradykinin beispielsweise die Rezeptorenzahl auf der Membranoberfläche vermindern, während Kallikrein eine Redistribution bewirkt. Die dehnungsbedingt stärker absinkende Bradykinin-Konzentration und andererseits die gesteigerte Kallikrein-Aktivität könnten dann die B<sub>2</sub>-Rezeptorregulation dynamisch beeinflussen. Diese Überlegungen müssten anhand tiefer greifender, zeitlich gestaffelter Versuchsreihen weiter untersucht werden.

In jedem Fall muss die beim vorliegenden Experiment fokussierte dritte Arbeitshypothese einer vermehrten Bradykinin-Rezeptorenbindung mit einer daraus folgenden Reduktion der freien Bradykinin-Konzentration aufgrund der ermittelten unveränderten Konzentrationen des B<sub>2</sub>-Rezeptors verworfen werden.

#### 5.2.5. Bedeutung der dehnungsinduzierten Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems

Bradykinin stellt die zentrale Komponente des Kinin-Kallikrein-Systems dar, das wie bereits dargelegt durch zyklische Dehnung von alveolären Typ-II-Zellen zur vermehrten Bradykinin-Produktion angeregt wird. Bradykinin vermag über seinen B<sub>2</sub>-Rezeptor anti-apoptotische Effekte zu vermitteln. Zahlreiche Studien berichten in verschiedensten Geweben von dieser zellprotektiven Wirkung des Bradykinins:

An alveolären Typ-II-Zellen der Ratte zeigten Hammerschmidt et al.(2007) in ihrem *in vitro*-Dehnexperiment, dass Bradykinin via B<sub>2</sub>-Rezeptor den PI3K/Akt/Bad-Signalweg aktiviert, über den zwei anti-apoptotische Proteine (Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>) gebildet werden, die Mitochondrien stabilisieren. Während zyklischer Überdehnung sind Mitochondrien in AT-II-Zellen einer Doppelbelastung ausgesetzt. Denn sie sind zum einen mit dem Zytoskelett verbunden, sodass der mechanische Stress direkt übertragen werden und ihre Permeabilität beeinträchtigen könnte (Hammerschmidt et al. 2007). Dafür spricht, dass es Ali et al. (2006) gelang, eine positive Korrelation zwischen mechanischem Stress und mitochondrialer Oxidanzien-Freisetzung zu zeigen. Zum anderen wird über das Absinken der Bradykinin-Konzentration aufgrund des dehnungsinduziert gesteigerten Bradykinin-Abbaus der

protektive anti-apoptotische Signalweg abgeschwächt. Folglich kommt es zu einer vermehrten Apoptose der gedehnten Zellen, die durch die Hemmung des Bradykinin-Abbaus beispielsweise durch den ACE-Inhibitor Captopril verhindert werden kann, wie Hammerschmidt et al. (2007) es in ihren Experimenten zeigen.

In einem *in vivo* Experiment an ventilierten eNOS knockout Mäusen konnten Peng et al. (2010) ebenfalls die zellprotektive Bedeutung des BKR2-vermittelten PI3K/Akt-Signalweges bestätigen (siehe auch Abbildung 2, Seite 20). Ventilierte eNOS knockout Mäuse, bei denen folglich eben dieser Signalweg nicht aktiviert werden kann, entwickelten eine deutlich schwerere VALI mit stärker ausgeprägter Schädigung der Blut-Gas-Barriere als gleichermaßen ventilierte wildtyp Mäuse. Bei weitergehender Untersuchung anhand eines *in vitro*-Modells alveolärer Typ-II-Zellen stellte sich heraus, dass die dehnungsbedingte Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges eine Kreuzaktivierung des p38/MAP-Kinase-Signalweges nach sich zieht, wodurch die Apoptose der AT-II-Zellen und letztendlich die Entstehung der VALI begünstigt wird (Peng et al. 2010).

Xu et al. (2012) untersuchten den Einfluss von exogenem Bradykinin auf TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose an pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Maus: Bradykinin verhinderte den induzierten Zelltod der  $\beta$ -Zellen wiederum über den BKR2-vermittelten PI3K/Akt/Bad-Signalweg, in dessen Folge die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> hochreguliert wird. Pro-apoptotische Signale hingegen, wie Expression des Bax-Proteins und die Aktivität von Caspase 3, werden durch Bradykinin gehemmt.

Im Gegensatz zu den Studien, die Bradykinin protektive Eigenschaften zuschreiben, insbesondere in Bezug auf die Entstehung der beatmungsassoziierten Lungenschädigung, stehen die Ergebnisse der VILI-Studie von Wösten-van Asperen et al. (2008). Sie ventilierten Ratten, die eine bzw. keine Captopril-Vorbehandlung erhalten hatten, mit hoher Druckamplitude für vier Stunden und führten anschließend Untersuchungen in deren BAL-Flüssigkeiten und Apoptosebestimmungen durch. Zwar bestätigen die Ergebnisse aus den BAL-Flüssigkeiten, dass zyklische Dehnung die ACE-Aktivität, d.h. auch den Bradykinin-Abbau, steigert, und dass sich die Hemmung des Angiotensin-konvertierenden Enzyms zellprotektiv auswirkt. Nach Untersuchung der Signalwege kommen die Autoren jedoch zu dem Schluss, dass diese Wirkung nicht über vermehrt vorhandenes Bradykinin und seinen BKR2, sondern über die Hemmung des Angiotensin-II-Signalweges vermittelt wird.



Verschiedene Studien zu Ischämie-/Reperfusionsschäden unterstützen hingegen die Annahme überaus günstiger Auswirkungen eines aktivierten Kinin-Kallikrein-Systems auf das Zellüberleben:

In experimentellen Studien zu zerebralen (Xia et al. 2004) und myokardialen (Yoshida et al. 2000; Yin et al. 2005) Ischämie-/Reperfusionverletzungen wurden den Versuchstieren (adulten Ratten) mithilfe eines transfizierten Adenovirus das humane Gen für t-Kallikrein übertragen. In allen Studien wurde bei diesen Tieren nach induzierter Ischämie und anschließender Reperfusion eine verminderte Apoptoserate der beeinträchtigten Zellen festgestellt, Xia et al. registrierten bei den Gliazellen sogar eine Annäherung der Apoptoserate an das Level der Kontrollgruppe. Durch spezifische BKR2-Hemmung ließ sich ebenfalls in allen drei Studien ermitteln, dass diese protektive anti-apoptotische Wirkung wiederum über den B<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt und durch Aktivierung des Akt/Bcl-2-Signalwegs exerziert wird.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es zahlreiche Belege für den zellprotektiven anti-apoptotischen Einfluss eines aktivierten Kinin-Kallikrein-Systems gibt, der in verschiedensten menschlichen und tierischen Geweben unter diversen pathologischen Stimuli nachgewiesen werden konnte. In alveolären Typ-II-Zellen, die zyklischer mechanischer Dehnung ausgesetzt werden, wie zum Beispiel bei maschineller Beatmung, ist dieser Einfluss insofern von Bedeutung, als dass zyklische Überdehnung nicht nur die Apoptoserate steigert sondern auch - wie als protektiver Gegenmechanismus der betroffenen Zelle - die Bradykinin-Produktion durch Kallikrein und Kininogen. Da dehnungsinduziert allerdings auch der Bradykinin-Abbau durch das Angiotensin-konvertierende Enzym in erheblichem Maße aktiviert wird, kämen die zellprotektiven Wirkungen des aktivierten Kallikrein-Kinin-Systems nur dann zum Tragen, wenn der gesteigerte Bradykinin-Abbau verhindert würde.

### 5.3. Schlussbetrachtungen und Ausblick

Maschinelle Beatmung ist in der heutigen Intensivmedizin als lebenserhaltende Maßnahme unverzichtbar, insbesondere in der Therapie des akuten Atemnotsyndroms (ARDS). Trotz lungenprotektiver Ventilationsstrategien (reduziertes  $V_T$  und angemessener PEEP) sind weitere beatmungsbedingte Lungenschädigungen (VALI/VILI) praktisch nicht zu vermeiden. Denn selbst bei niedrigen Tidalvolumina kann es aufgrund der Inhomogenität der ARDS-Lunge in manchen Lungenarealen zur maximalen Inflation und dadurch zur Zellschädigung kommen (*baby lung effect*). Die Mortalität von ARDS-Patienten ist mit über 40 % erschreckend hoch und ließ sich trotz verbesserter Beatmungstherapie in den letzten Jahren nicht entscheidend reduzieren (Wang et al. 2014; Villar et al. 2011).

Wünschenswert wäre also die Möglichkeit, ARDS zusätzlich pharmakologisch zu therapieren oder gar einer ventilationsassoziierten Schädigung bzw. Exazerbation vorzubeugen.

Überblähung, das heißt Überdehnung von alveolärem Epithel im *in vitro*-Experiment, führte bei etwa einem Drittel der Zellen zum kontrollierten Zelltod (Hammerschmidt et al. 2004). Diese Apoptose zu verhindern ist ein wichtiger pharmakologischer Therapieansatz. Eine unerlässliche Voraussetzung dafür bildet die Exploration der anti- bzw. pro-apoptotischen Signalwege, die durch mechanische Überdehnung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Dazu leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag, indem sie den Einfluss mechanischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen untersucht, das durch seine zentrale Komponente Bradykinin rezeptorvermittelt anti-apoptotische Signalwege aktivieren kann.

In Übereinstimmung mit der experimentellen Studie von Hammerschmidt et al. (2007) konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein Konzentrationsabfall von Bradykinin als Reaktion auf zyklische Dehnung festgestellt werden. Im Fokus der weiteren Experimente stand die Ergründung der Ursachen dieses Konzentrationsrückgangs: Es zeigte sich eine gesteigerte Produktion des Bradykinin-Vorläuferproteins Kininogen 1 und eine erhöhte Aktivität des Bradykinin-bildenden Enzyms Kallikrein, aber auch eine starke Zunahme der Bradykinin-abbauenden Aktivität, sodass sich die Bradykinin-Konzentration insgesamt dehnungsbedingt verringerte. Das anti-apoptotische Potenzial des Bradykinins im Sinne eines Zellschutzes

gegen Überdehnung konnte also nicht ausgeschöpft werden. Grund dafür scheint die Kurzlebigkeit von Bradykinin zu sein, die vor allem von der Inaktivierung durch das Angiotensin-konvertierende Enzym bestimmt wird.

Um die Forschung in Richtung einer pharmakologischen Nutzbarmachung des anti-apoptotischen Potenzials von Bradykinin voranzutreiben, könnten unter anderem folgende Untersuchungen weiterführend sein:

Zur Frage, ob sich die dehnungsinduzierte Bradykinin-Produktion noch weiter steigern lässt, könnte die *in vitro*-Dehnung isolierter AT-II-Zellen unter Zugabe von Kallikrein durchgeführt werden. Eventuelle protektive Effekte auf den Zelltod könnten anschließend mittels FACS Apoptose-Analyse quantifiziert werden. Interessant wären hierbei auch die Effekte von Kallikrein auf den BKR2. Kallikrein wurde von Hecquet et al. (2000, 2002) ebenfalls als direkter B<sub>2</sub>-Rezeptoragonist identifiziert und bewirkt in BKR2-transfizierten Ovarialzellen des Hamsters neben der Rezeptoraktivierung auch dessen Redistribution auf der Zellmembran. Ob sich diese Ergebnisse auch in AT-II-Zellen unter Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung bestätigen ließen, könnte im Rahmen eines Dehnexperiments unter Zugabe von Kallikrein geprüft werden.

Ein weiterer Ansatz wären Versuche zur BKR2-Aktivierung durch synthetische Agonisten: Um der Kurzlebigkeit von Bradykinin unter Dehnungsbedingungen zu begegnen, könnte Bradykinin im *in vitro*-Dehnexperiment mit einer synthetischen Alternative ersetzt werden. So wurde beispielsweise von Savard et al. (2013) mit synthetisierbarem „NG291“, ein bereits voll wirksamer Agonist entwickelt. Verglichen mit natürlichem Bradykinin ist NG291 stabiler und gegen die Inaktivierung durch ACE resistent. Seine pharmakologische Wirksamkeit wurde bereits in verschiedenen Spezies in vergleichbarem Maße nachgewiesen (Mensch, Ratte, Kaninchen, Maus). Zudem ist NG291 für den B<sub>2</sub>-Rezeptor selektiv und spezifisch und besitzt höhere Affinität und Aktivität am Rezeptor (Savard et al. 2013). Savard und Kollegen gewannen diese Kenntnisse vor allem an glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Maus. Die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf alveoläre Epithelzellen bedürfte zunächst der Klärung. Anschließend könnte man sich den Wirkungen auf das Kinin-Kallikrein-System widmen, und zwar mit besonderer Aufmerksamkeit für die Entwicklung der Rezeptorendichte. Die Resistenz gegenüber ACE könnte nämlich durch andauernde Stimulation zu einer raschen Desensibilisierung und Internalisierung des B<sub>2</sub>-Rezeptors führen

- ein Effekt, der bei ähnlichen synthetischen B<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten bereits beobachtet werden konnte (Bawolak et al. 2009).

*In vitro*-Dehnversuche zur Hemmung des BK-Abbaus mittels ACE-Inhibitor Captopril wurden bereits durchgeführt und lieferten vielversprechende Ergebnisse (Hammerschmidt et al. 2007). Ein nächster Schritt in diese Richtung könnte eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Captopril sein, um *in vivo* eine Verlangsamung des Bradykinin-Abbaus und dadurch bei anschließenden *in vitro*-Dehnexperimenten isolierter AT-II-Zellen eventuell entstehende zellprotektive Wirkungen zu überprüfen.

## **6. Zusammenfassung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

### **Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte**

eingereicht von

Anna Felicitas Schweinberger

angefertigt an der

Medizinischen Klinik 1, Abteilung für Pneumologie

Universität Leipzig

Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz

Betreuer: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz

Dr. rer. nat. Hartmut Kuhn

Juni 2016

Die maschinelle Beatmung ist ein unerlässlicher Bestandteil der heutigen Intensivmedizin. Bei respiratorischer Insuffizienz ist sie essentiell, um eine ausreichende Oxygenierung der Patienten zu gewährleisten. Insbesondere beim akuten Atemnotsyndrom (ARDS) steht sie als lebenserhaltende Maßnahme alternativlos im Mittelpunkt des Therapiemanagements. Gerade bei vorgeschädigten Lungen, wie sie beim ARDS vorliegen, sind weitere beatmungsbedingte Schädigungen (VALI/VILI) durch Überblähung, Scherstress und Recruitment/Derecruitment praktisch vorprogrammiert. Selbst bei sogenannter protektiver Beatmung mit geringem Tidalvolumen und positivem endexpiratorischem Druck, wie sie in

der ARDS Network Studie (2000) empfohlen wird, ist die unphysiologische Überdehnung einzelner Lungenabschnitte aufgrund der Inhomogenität der Schädigung bei ARDS unvermeidbar. Dadurch kommt es unter anderem über die Induktion von Apoptose in alveolären Epithelzellen zur weiteren Schädigung der Blut-Gas-Barriere und häufig zu einer Exazerbation des Syndroms.

Dem Nonapeptid Bradykinin wurde in alveolären Typ-II-Zellen eine zellprotektive Wirkung über die rezeptorvermittelte Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalweges nachgewiesen, durch die dehnungsbedingte Apoptose von AT-II-Zellen *in vitro* verhindert werden konnte (Hammerschmidt et al. 2007). Bradykinin ist die zentrale Komponente des Kinin-Kallikrein-Systems, dessen Beeinflussung durch zyklische mechanische Dehnung in der vorliegenden Arbeit thematisiert wird.

Dazu wurde in einem etablierten *in vitro*-Modell alveoläre Überblähung simuliert: Isolierte alveoläre Typ-II-Zellen gesunder erwachsener Ratten wurden auf Dehnungsmembranen kultiviert und für 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung ausgesetzt. Anschließend wurden verschiedene Analysen auf Proteinebene jeweils im Vergleich zur ungedehnten Zellkultur durchgeführt. Im Einzelnen wurden der Einfluss auf Konzentration, Produktion und Abbau von Bradykinin sowie die Beeinflussung des Bradykinin-Rezeptors 2 untersucht.

Die Ergebnisse ergaben folgendes Bild:

Insgesamt sinkt die extrazelluläre Bradykinin-Konzentration durch zyklische mechanische Dehnung - dieses Ergebnis steht mit anderen experimentellen Studien im Einklang (Hammerschmidt et al. 2007). Durch die vorliegenden Versuche stellte sich heraus, dass für diesen Konzentrationsabfall die dehnungsbedingt stark gesteigerte Bradykinin-abbauende Aktivität verantwortlich ist. Diese sorgt trotz einer Steigerung der Bradykinin-Produktion durch Kininogen und Kallikrein, für einen Rückgang der extrazellulären Bradykinin-Konzentration. Der Bradykinin-Rezeptor 2 zeigte in den durchgeführten Analysen keine signifikante Konzentrationsveränderung.

Durch das dehnungsbedingte Absinken der Bradykinin-Konzentration wird der anti-apoptotische PI3K/Akt-Signalweg rezeptorvermittelt in geringerem Maße aktiviert. Die überwiegenden pro-apoptotischen Signale leiten vermehrt den Zelltod ein, wodurch die Entstehung einer beatmungsbedingten Lungenschädigung (VALI/VILI) in entscheidendem

Maße begünstigt wird. Um in eben diese Signalketten pharmakologisch eingreifen zu können, ist die Kenntnis der biochemischen Vorgänge auf Zellebene und deren mechanische Beeinflussung grundlegend. Dazu leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag. Sie dient dem tieferen Verständnis des Kinin-Kallikrein-Systems in alveolären Typ-II-Zellen und beleuchtet den Zusammenhang mit der Entstehung von beatmungsbedingten Lungenschäden im Rahmen des ARDS. In diesem Sinne schafft sie eine Voraussetzung, um potentielle pharmakologische Angriffspunkte erkennen und die Therapie des ARDS weiterentwickeln zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

- Afshari, Arash; Brok, Jesper; Møller, Ann Merete; Wetterslev, Jørn (2010): Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury in children and adults. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (7), S. CD002787. DOI: 10.1002/14651858.CD002787.pub2.
- Alcorn, J. L.; Smith, M. E.; Smith, J. F.; Margraf, L. R.; Mendelson, C. R. (1997): Primary cell culture of human type II pneumocytes: maintenance of a differentiated phenotype and transfection with recombinant adenoviruses. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17 (6), S. 672–682. DOI: 10.1165/ajrcmb.17.6.2858.
- Ali, Mir H.; Mungai, Paul T.; Schumacker, Paul T. (2006): Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 291 (1), S. L38-45. DOI: 10.1152/ajplung.00287.2004.
- Anzueto, A.; Baughman, R. P.; Guntupalli, K. K.; Weg, J. G.; Wiedemann, H. P.; Raventós, A. A. et al. (1996): Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. In: *The New England Journal of Medicine* 334 (22), S. 1417–1421. DOI: 10.1056/NEJM199605303342201.
- Argiras, E.; Blakeley, C.; Dunnill, M.; Otremski, S.; Sykes, M. (1987): High Peep Decreases Hyaline Membrane Formation in Surfactant Deficient Lungs. In: *Br. J. Anaesth.* (59), S. 1278–1285.
- Arold, Stephen P.; Bartolak-Suki, Erzsebet; Suki, Bela (2009): Variable stretch pattern enhances surfactant secretion in alveolar type II cells in culture. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 296 (4), S. L574-81. DOI: 10.1152/ajplung.90454.2008.
- Ashbaugh, David G.; Bigelow, D. Boyd; Petty, Thomas L.; Levine, Bernard E. (2005): Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. The Lancet, Saturday 12 August 1967. In: *Crit Care Resusc* 7 (1), S. 60–61.
- Banes, A. J.; Gilbert, J.; Taylor, D.; Monbureau, O. (1985): A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. In: *J Cell Sci* 75, S. 35–42.
- Barauna, Valerio Garrone; Campos, Luciene Cristina Gastalho; Miyakawa, Ayumi Aurea; Krieger, Jose Eduardo (2011): ACE as a mechanosensor to shear stress influences the control of its own regulation via phosphorylation of cytoplasmic Ser(1270). In: *PLoS One* 6 (8), S. e22803. DOI: 10.1371/journal.pone.0022803.
- Bardales, R. H.; Xie, S. S.; Schaefer, R. F.; Hsu, S. M. (1996): Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. In: *Am J Pathol* 149 (3), S. 845–852.



- Barthwal, Manoj K.; Sathyanarayana, Pradeep; Kundu, Chanakya N.; Rana, Basabi; Pradeep, Anamika; Sharma, Chandan et al. (2003): Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (6), S. 3897–3902. DOI: 10.1074/jbc.M211598200.
- Baumgarten, C. R.; Schwarting, R.; Kunkel, G. (1989): Localization of glandular kallikrein in nasal mucosa of allergic and nonallergic individuals. In: *Adv Exp Med Biol* 247B, S. 523–528.
- Bawolak, Marie-Therese; Fortin, Sebastien; Bouthillier, Johanne; Adam, Albert; Gera, Lajos; C-Gaudreault, Rene; Marceau, Francois (2009): Effects of inactivation-resistant agonists on the signalling, desensitization and down-regulation of bradykinin B(2) receptors. In: *British journal of pharmacology* 158 (5), S. 1375–1386. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00409.x.
- Bengtson, Sara H.; Eddleston, Jane; Morgelin, Matthias; Zuraw, Bruce L.; Herwald, Heiko (2008): Regulation of kinin B(2) receptors by bradykinin in human lung cells. In: *Biological chemistry* 389 (11), S. 1435–1440. DOI: 10.1515/BC.2008.159.
- Berger, L. C.; Burri, P. H. (1985): Timing of the quantitative recovery in the regenerating rat lung. In: *Am Rev Respir Dis* 132 (4), S. 777–783.
- Bernard, G. R.; Artigas, A.; Brigham, K. L.; Carlet, J.; Falke, K.; Hudson, L. et al. (1994): The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. In: *Am J Respir Crit Care Med* 149 (3 Pt 1), S. 818–824. DOI: 10.1164/ajrccm.149.3.7509706.
- Bernstein, Kenneth E.; Shen, Xiao Z.; Gonzalez-Villalobos, Romer A.; Billet, Sandrine; Okwan-Duodu, Derick; Ong, Frank S.; Fuchs, Sebastien (2011): Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). In: *Current opinion in pharmacology* 11 (2), S. 105–111. DOI: 10.1016/j.coph.2010.11.001.
- Bilek, Anastacia M.; Dee, Kay C.; Gaver, Donald P. (2003): Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 94 (2), S. 770–783. DOI: 10.1152/japplphysiol.00764.2002.
- Bossi, Fleur; Peerschke, Ellinor I.; Ghebrehiwet, Berhane; Tedesco, Francesco (2011): Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability. In: *Immunol Lett* 140 (1-2), S. 7–13. DOI: 10.1016/j.imlet.2011.06.006.
- Bowton, D. L.; Kong, D. L. (1989): High tidal volume ventilation produces increased lung water in oleic acid-injured rabbit lungs. In: *Crit Care Med* 17 (9), S. 908–911.
- Brody, J. S.; Burki, R.; Kaplan, N. (1978): Deoxyribonucleic acid synthesis in lung cells during compensatory lung growth after pneumonectomy. In: *Am Rev Respir Dis* 117 (2), S. 307–316.
- Brown, T. D. (2000): Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. In: *J Biomech* 33 (1), S. 3–14.

- Burnham, Ellen L.; Taylor, W. Robert; Quyyumi, Arshed A.; Rojas, Mauricio; Brigham, Kenneth L.; Moss, Marc (2005): Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 172 (7), S. 854–860. DOI: 10.1164/rccm.200410-1325OC.
- Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F.; Stanbridge, E. et al. (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. In: *Science* 282 (5392), S. 1318–1321.
- Castro, Claudia Y. (2006): ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. In: *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 18 (1), S. 13–19. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2006.02.001.
- Chao, J.; Simson, J. A.; Chung, P.; Chen, L. M.; Chao, L. (1993): Regulation of kininogen gene expression and localization in the lung after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 203 (2), S. 243–250.
- Christiaans, Sarah C.; Wagener, Brant M.; Esmon, Charles T.; Pittet, Jean Francois (2013): Protein C and acute inflammation: a clinical and biological perspective. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (7), S. L455-66. DOI: 10.1152/ajplung.00093.2013.
- Cohen, A. J.; Bunn, P. A.; Franklin, W.; Magill-Solc, C.; Hartmann, C.; Helfrich, B. et al. (1996): Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. In: *Cancer research* 56 (4), S. 831–839.
- Colman, R. W.; Jameson, B. A.; Lin, Y.; Johnson, D.; Mousa, S. A. (2000): Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. In: *Blood* 95 (2), S. 543–550.
- Colman, R. W.; Schmaier, A. H. (1997): Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. In: *Blood* 90 (10), S. 3819–3843.
- Colman, Robert W. (2006): Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. In: *Curr Pharm Des* 12 (21), S. 2599–2607.
- Corbridge, T. C.; Wood, L. D.; Crawford, G. P.; Chudoba, M. J.; Yanos, J.; Sznajder, J. I. (1990): Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration. In: *Am Rev Respir Dis* 142 (2), S. 311–315. DOI: 10.1164/ajrccm/142.2.311.
- Costerousse, O.; Allegrini, J.; Lopez, M.; Alhenc-Gelas, F. (1993): Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. In: *Biochem J* 290 (Pt 1), S. 33–40.
- Couture, Réjean; Harisson, Madelaine; Vianna, Rose Mari; Cloutier, Frank (2001): Kinin receptors in pain and inflammation. In: *European Journal of Pharmacology* 429 (1-3), S. 161–176. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01318-8.

- Cyr, M.; Lepage, Y.; Blais, C., JR; Gervais, N.; Cugno, M.; Rouleau, J. L.; Adam, A. (2001): Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (1), S. H275-83.
- Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E. (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. In: *Cell* 91 (2), S. 231–241.
- Davidovich, N.; Chhour, P.; Margulies, S. S. (2013): Uses of Remnant Human Lung Tissue for Mechanical Stretch Studies. In: *Cell Mol Bioeng* 6 (2), S. 175–182. DOI: 10.1007/s12195-012-0263-6.
- Dobbs, L. G.; Gonzalez, R.; Williams, M. C. (1986): An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. In: *Am Rev Respir Dis* 134 (1), S. 141–145.
- Dragovic, T.; Igic, R.; Erdos, E. G.; Rabito, S. F. (1993): Metabolism of bradykinin by peptidases in the lung. In: *Am Rev Respir Dis* 147 (6 Pt 1), S. 1491–1496. DOI: 10.1164/ajrccm/147.6\_Pt\_1.1491.
- Dreyfuss, D.; Saumon, G. (1998): Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. In: *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1), S. 294–323. DOI: 10.1164/ajrccm.157.1.9604014.
- Dreyfuss, D.; Soler, P.; Basset, G.; Saumon, G. (1988): High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. In: *Am Rev Respir Dis* 137 (5), S. 1159–1164. DOI: 10.1164/ajrccm/137.5.1159.
- Edwards, Y. S.; Sutherland, L. M.; Power, J. H.; Nicholas, T. E.; Murray, A. W. (1999): Cyclic stretch induces both apoptosis and secretion in rat alveolar type II cells. In: *FEBS letters* 448 (1), S. 127–130.
- Elbert, K. J.; Schafer, U. F.; Schafers, H. J.; Kim, K. J.; Lee, V. H.; Lehr, C. M. (1999): Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. In: *Pharm Res* 16 (5), S. 601–608.
- Fink, Edwin; Bhoola, Kanti D.; Snyman, Celia; Neth, Peter; Figueroa, Carlos D. (2007): Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. In: *Biological chemistry* 388 (9), S. 957–963. DOI: 10.1515/BC.2007.104.
- Fothergill, John (1744-45): Observations on a case published in the last volume of the medical essays, &c. of recovering a man dead in appearance, by distending the lungs with air. In: *Phil Trans R Soc Med* (43), S. 275–281.
- Frutos-Vivar, Fernando; Ferguson, Niall D.; Esteban, Andrés (2006): Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27 (4), S. 327–336. DOI: 10.1055/s-2006-948287.

Fust, H.; Hartmann, H. (1961): A simple apparatus for registration of respiratory frequency of rats and mice with negative temperature coefficient resistance. In: *Int Z Angew Physiol* 18, S. 478–482.

Gattinoni, Luciano; Pesenti, Antonio (2005): The concept of "baby lung". In: *Intensive care medicine* 31 (6), S. 776–784. DOI: 10.1007/s00134-005-2627-z.

Gerlach, Anthony T.; Murphy, Claire (2011): An update on nutrition support in the critically ill. In: *Journal of pharmacy practice* 24 (1), S. 70–77. DOI: 10.1177/0897190010388142.

Gilbert, J. A.; Weinhold, P. S.; Banes, A. J.; Link, G. W.; Jones, G. L. (1994): Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro. In: *J Biomech* 27 (9), S. 1169–1177.

Girolami, J. P.; Alhenc-Gelas, F.; Dos Reis, M L; Bascands, J. L.; Suc, J. M.; Corvol, P.; Menard, J. (1986): Hydrolysis of rat high molecular weight kininogen by purified rat urinary kallikrein: identification of bradykinin as the kinin formed. In: *Adv Exp Med Biol* 198 Pt A, S. 137–145.

Gonzalez, Robert F.; Allen, Lennell; Gonzales, Linda; Ballard, Philip L.; Dobbs, Leland G. (2010): HTII-280, a biomarker specific to the apical plasma membrane of human lung alveolar type II cells. In: *J Histochem Cytochem* 58 (10), S. 891–901. DOI: 10.1369/jhc.2010.956433.

Graf, K.; Grafe, M.; Bossaller, C.; Niehus, J.; Schulz, K. D.; Auch-Schwelk, W.; Fleck, E. (1993): Degradation of bradykinin by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in cultured human endothelial cells. In: *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 31 (5), S. 267–272.

Guérin, Claude; Reignier, Jean; Richard, Jean-Christophe; Beuret, Pascal; Gacouin, Arnaud; Boulain, Thierry et al. (2013): Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* 368 (23), S. 2159–2168. DOI: 10.1056/NEJMoa1214103.

Gutierrez, J. A.; Ertsey, R.; Scavo, L. M.; Collins, E.; Dobbs, L. G. (1999): Mechanical distention modulates alveolar epithelial cell phenotypic expression by transcriptional regulation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21 (2), S. 223–229. DOI: 10.1165/ajrcmb.21.2.3665.

Habre, W.; Peták, F. (2014): Perioperative use of oxygen: variabilities across age. In: *British journal of anaesthesia* 113 Suppl 2, S. ii26–36. DOI: 10.1093/bja/aeu380.

Halbertsma, F. J. J.; Vaneker, M.; Scheffer, G. J.; van der Hoeven, J. G. (2005): Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. In: *Neth J Med* 63 (10), S. 382–392.

Hammerschmidt, Stefan; Kuhn, Hartmut; Gessner, Christian; Seyfarth, Hans-Jurgen; Wirtz, Hubert (2007): Stretch-induced alveolar type II cell apoptosis: role of endogenous bradykinin and PI3K-Akt signaling. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 37 (6), S. 699–705. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0429OC.

Hammerschmidt, Stefan; Kuhn, Hartmut; Grasenack, Thomas; Gessner, Christian; Wirtz, Hubert (2004): Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30 (3), S. 396–402. DOI: 10.1165/rcmb.2003-0136OC.

Hammerschmidt, Stefan; Kuhn, Hartmut; Sack, Ulrich; Schlenska, Anke; Gessner, Christian; Gillissen, Adrian; Wirtz, Hubert (2005): Mechanical stretch alters alveolar type II cell mediator release toward a proinflammatory pattern. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33 (2), S. 203–210. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0067OC.

Han, SeungHye; Mallampalli, Rama K. (2015): The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (3), S. 855–860. DOI: 10.4049/jimmunol.1402513.

Hassan, Sarmina; Sainz, Irma M.; Khan, Mohammad M.; Bradford, Harlan N.; Isordia-Salas, Irma; Kashem, Sakeen W. et al. (2007): Antithrombotic activity of kininogen is mediated by inhibitory effects of domain 3 during arterial injury in vivo. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (6), S. H2959–65. DOI: 10.1152/ajpheart.00730.2006.

Hecquet, C.; Tan, F.; Marcic, B. M.; Erdos, E. G. (2000): Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. In: *Molecular pharmacology* 58 (4), S. 828–836.

Hecquet, Claudie; Becker, Robert P.; Tan, Fulong; Erdos, Ervin G. (2002): Kallikreins when activating bradykinin B2 receptor induce its redistribution on plasma membrane. In: *Int Immunopharmacol* 2 (13-14), S. 1795–1806.

Hess, J. F.; Borkowski, J. A.; Young, G. S.; Strader, C. D.; Ransom, R. W. (1992): Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. In: *Biochem Biophys Res Commun* 184 (1), S. 260–268.

Hilgenfeldt, Ulrich; Stannek, Christina; Lukasova, Martina; Schnolzer, Martina; Lewicka, Sabina (2005): Rat tissue kallikrein releases a kallidin-like peptide from rat low-molecular-weight kininogen. In: *British journal of pharmacology* 146 (7), S. 958–963. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706409.

Houle, Steeve; Marceau, Francois (2003): Wortmannin alters the intracellular trafficking of the bradykinin B2 receptor: role of phosphoinositide 3-kinase and Rab5. In: *Biochem J* 375 (Pt 1), S. 151–158. DOI: 10.1042/BJ20030872.

Hsia, Connie C W (2004): Signals and mechanisms of compensatory lung growth. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 97 (5), S. 1992–1998. DOI: 10.1152/japplphysiol.00530.2004.

Hu, Bo; Song, Jian Tao; Qu, Hai Yan; Bi, Chen Long; Huang, Xiao Zhen; Liu, Xin Xin; Zhang, Mei (2014): Mechanical stretch suppresses microRNA-145 expression by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and upregulating angiotensin-converting enzyme to alter

vascular smooth muscle cell phenotype. In: *PLoS One* 9 (5), S. e96338. DOI: 10.1371/journal.pone.0096338.

Iwata, Kentaro; Doi, Asako; Ohji, Goh; Oka, Hideaki; Oba, Yuichiro; Takimoto, Kohei et al. (2010): Effect of Neutrophil Elastase Inhibitor (Sivelestat Sodium) in the Treatment of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Intern. Med.* 49 (22), S. 2423–2432. DOI: 10.2169/internalmedicine.49.4010.

Kane, L. P.; Shapiro, V. S.; Stokoe, D.; Weiss, A. (1999): Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. In: *Curr Biol* 9 (11), S. 601–604.

Kaplan, Allen P.; Joseph, Kusumam; Silverberg, Michael (2002): Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. In: *J Allergy Clin Immunol* 109 (2), S. 195–209.

Kashuba, Elena; Bailey, James; Allsup, David; Cawkwell, Lynn (2013): The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. In: *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 18 (4), S. 279–296. DOI: 10.3109/1354750X.2013.787544.

Kato, H.; Enjyoji, K.; Miyata, T.; Hayashi, I.; Oh-ishi, S.; Iwanaga, S. (1985): Demonstration of arginyl-bradykinin moiety in rat HMW kininogen: direct evidence for liberation of bradykinin by rat glandular kallikreins. In: *Biochem Biophys Res Commun* 127 (1), S. 289–295.

Keil, Cora; Maskos, Klaus; Than, Manuel; Hoopes, J. Todd; Huber, Robert; Tan, Fulong et al. (2007): Crystal structure of the human carboxypeptidase N (kininase I) catalytic domain. In: *Journal of molecular biology* 366 (2), S. 504–516. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.11.025.

Kokkonen, J. O.; Lindstedt, K. A.; Kuoppala, A.; Kovanen, P. T. (2000): Kinin-degrading pathways in the human heart. In: *Trends in cardiovascular medicine* 10 (1), S. 42–45.

Kuchnicka, Katarzyna; Maciejewski, Dariusz (2013): Ventilator-associated lung injury. In: *Anaesthesiology intensive therapy* 45 (3), S. 164–170. DOI: 10.5603/AIT.2013.0034.

Kuhr, F.; Lowry, J.; Zhang, Y.; Brovkovich, V.; Skidgel, R. A. (2010): Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. In: *Neuropeptides* 44 (2), S. 145–154. DOI: 10.1016/j.npep.2009.12.004.

Kuoppala, A.; Lindstedt, K. A.; Saarinen, J.; Kovanen, P. T.; Kokkonen, J. O. (2000): Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278 (4), S. H1069-74.

Leeb-Lundberg, L.; Marceau, F.; Muller-Esterl, W.; Pettibone, D.; Zuraw, B. (2005): International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. In: *Pharmacol Rev* 57 (1), S. 27–77. DOI: 10.1124/pr.57.1.2.

- Li, Y.; Sato, T. (2001): Dual signaling via protein kinase C and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt contributes to bradykinin B2 receptor-induced cardioprotection in guinea pig hearts. In: *J Mol Cell Cardiol* 33 (11), S. 2047–2053. DOI: 10.1006/jmcc.2001.1455.
- Liang, F.; Gardner, D. G. (1998): Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (23), S. 14612–14619.
- Liu, M.; Tanswell, A. K.; Post, M. (1999): Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. In: *The American journal of physiology* 277 (4 Pt 1), S. L667-83.
- MacDonald, R. J.; Margolius, H. S.; Erdos, E. G. (1988): Molecular biology of tissue kallikrein. In: *Biochem J* 253 (2), S. 313–321.
- Malhotra, R.; Sadoshima, J.; Brosius, F C 3rd; Izumo, S. (1999): Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. In: *Circulation research* 85 (2), S. 137–146.
- Mann, E. A.; Lingrel, J. B. (1991): Developmental and tissue-specific expression of rat T-kininogen. In: *Biochem Biophys Res Commun* 174 (2), S. 417–423.
- Marceau, F.; Hess, J. F.; Bachvarov, D. R. (1998): The B1 receptors for kinins. In: *Pharmacol Rev* 50 (3), S. 357–386.
- Marcondes, S.; Antunes, E. (2005): The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system. In: *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3 (1), S. 33–44.
- Menke, J. G.; Borkowski, J. A.; Bierilo, K. K.; MacNeil, T.; Derrick, A. W.; Schneck, K. A. et al. (1994): Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (34), S. 21583–21586.
- Muscudere, J. G.; Mullen, J. B.; Gan, K.; Slutsky, A. S. (1994): Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 149 (5), S. 1327–1334. DOI: 10.1164/ajrccm.149.5.8173774.
- Nagae, A.; Abe, M.; Becker, R. P.; Deddish, P. A.; Skidgel, R. A.; Erdos, E. G. (1993): High concentration of carboxypeptidase M in lungs: presence of the enzyme in alveolar type I cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 9 (2), S. 221–229. DOI: 10.1165/ajrcmb/9.2.221.
- Neth, P.; Arnhold, M.; Nitschko, H.; Fink, E. (2001): The mRNAs of prekallikrein, factors XI and XII, and kininogen, components of the contact phase cascade are differentially expressed in multiple non-hepatic human tissues. In: *Thrombosis and haemostasis* 85 (6), S. 1043–1047.
- Nowak, Wanda; Errasti, Andrea Emilse; Armesto, Arnaldo Raul; Santin Velazque, Natalia Lucia; Rothlin, Rodolfo Pedro (2011): Endothelial angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase in isolated human umbilical vein: an effective bradykinin inactivation

- pathway. In: *European Journal of Pharmacology* 667 (1-3), S. 271–277. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.05.045.
- Oeckler, R. A.; Hubmayr, R. D. (2007): Ventilator-associated lung injury: a search for better therapeutic targets. In: *The European respiratory journal* 30 (6), S. 1216–1226. DOI: 10.1183/09031936.00104907.
- Okamoto, H.; Greenbaum, L. M. (1983): Isolation and structure of T-kinin. In: *Biochem Biophys Res Commun* 112 (2), S. 701–708.
- Okamoto, H.; Greenbaum, L. M. (1986): Isolation and properties of two rat plasma T-kininogens. In: *Adv Exp Med Biol* 198 Pt A, S. 69–75.
- Okamoto, H.; Takano, M.; Yokoyama, K.; Kondo, J.; Yayama, K. (1996): Fibroblasts synthesize kininogen in response to inflammatory mediators. In: *Immunopharmacology* 32 (1-3), S. 28–33.
- O'Riordan, T. G.; Weinstein, M. D.; Abraham, W. M.; Forteza, R. (2003): Elevated tissue kallikrein activity in airway secretions from patients with tracheobronchitis associated with prolonged mechanical ventilation. In: *Lung* 181 (5), S. 237–244.
- Paine, Robert; Standiford, Theodore J.; Dechert, Ronald E.; Moss, Marc; Martin, Gregory S.; Rosenberg, Andrew L. et al. (2012): A randomized trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for patients with acute lung injury. In: *Crit Care Med* 40 (1), S. 90–97. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31822d7bf0.
- Papazian, Laurent; Forel, Jean-Marie; Gacouin, Arnaud; Penot-Ragon, Christine; Perrin, Gilles; Loundou, Anderson et al. (2010): Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* 363 (12), S. 1107–1116. DOI: 10.1056/NEJMoa1005372.
- Peng, Xin-qi; Damarla, Mahendra; Skirball, Jarrett; Nonas, Stephanie; Wang, Xiao-ying; Han, Eugenia J. et al. (2010): Protective role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling in mechanical stress through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse lung. In: *Acta pharmacologica Sinica* 31 (2), S. 175–183. DOI: 10.1038/aps.2009.190.
- Perlman, Carrie E.; Bhattacharya, Jahar (2007): Alveolar expansion imaged by optical sectioning microscopy. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 103 (3), S. 1037–1044. DOI: 10.1152/jappphysiol.00160.2007.
- Peter, John Victor; John, Preeta; Graham, Petra L.; Moran, John L.; George, Ige Abraham; Bersten, Andrew (2008): Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 336 (7651), S. 1006–1009. DOI: 10.1136/bmj.39537.939039.BE.
- Phagoo, S. B.; Poole, S.; Leeb-Lundberg, L. M. (1999): Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 $\beta$  shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. In: *Molecular pharmacology* 56 (2), S. 325–333.



- Poblete, M. T.; Garces, G.; Figueroa, C. D.; Bhoola, K. D. (1993): Localization of immunoreactive tissue kallikrein in the seromucous glands of the human and guinea-pig respiratory tree. In: *The Histochemical journal* 25 (11), S. 834–839.
- Prado, Gregory N.; Taylor, Linda; Zhou, Xiaofeng; Ricupero, Dennis; Mierke, Dale F.; Polgar, Peter (2002): Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. In: *J Cell Physiol* 193 (3), S. 275–286. DOI: 10.1002/jcp.10175.
- Prost, Nicolas de; Ricard, Jean-Damien; Saumon, Georges; Dreyfuss, Didier (2011): Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. In: *Annals of intensive care* 1 (1), S. 28. DOI: 10.1186/2110-5820-1-28.
- Pugin, Jérôme (2003): Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. In: *Crit Care Med* 31 (4 Suppl), S. S200-6. DOI: 10.1097/01.CCM.0000057844.31307.ED.
- Rafii, Shahin; Lyden, David (2003): Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. In: *Nat Med* 9 (6), S. 702–712. DOI: 10.1038/nm0603-702.
- Ramirez-Molina, Cesar; Heudi, Olivier; Pullen, Mark; Marshall, Peter S. (2006): Study of bradykinin metabolism by rat lung tissue membranes and rat kidney brush border membranes by HPLC with inductively coupled plasma-mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. In: *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 12 (3), S. 220–226. DOI: 10.1002/psc.712.
- Ranieri, V. Marco; Rubenfeld, Gordon D.; Thompson, B. Taylor; Ferguson, Niall D.; Caldwell, Ellen; Fan, Eddy et al. (2012): Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. In: *JAMA* 307 (23), S. 2526–2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- Ricard, J-D.; Dreyfuss, D.; Saumon, G. (2003): Ventilator-induced lung injury. In: *European Respiratory Journal* 22 (Supplement 42), S. 2s–9. DOI: 10.1183/09031936.03.00420103.
- Ricciardolo, Fabio L M; Sorbello, Valentina; Benedetto, Sabrina; Defilippi, Ilaria; Sabatini, Federica; Robotti, Andrea et al. (2012): Bradykinin- and lipopolysaccharide-induced bradykinin B2 receptor expression, interleukin 8 release and "nitrosative stress" in bronchial epithelial cells BEAS-2B: role for neutrophils. In: *European Journal of Pharmacology* 694 (1-3), S. 30–38. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.051.
- Rice, Todd W.; Wheeler, Arthur P.; Thompson, B. Taylor; deBoisblanc, Bennett P.; Steingrub, Jay; Rock, Peter (2011): Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury. In: *JAMA* 306 (14), S. 1574–1581. DOI: 10.1001/jama.2011.1435.
- Rieder, M. J.; Carmona, R.; Krieger, J. E.; Pritchard, K A Jr; Greene, A. S. (1997): Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. In: *Circulation research* 80 (3), S. 312–319.

- Rojkjaer, R.; Schmaier, A. H. (1999): Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cells. In: *Proc Assoc Am Physicians* 111 (3), S. 220–227.
- Sainz, Irma M.; Pixley, Robin A.; Colman, Robert W. (2007): Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. In: *Thrombosis and haemostasis* 98 (1), S. 77–83.
- Sanchez-Esteban, J.; Cicchiello, L. A.; Wang, Y.; Tsai, S. W.; Williams, L. K.; Torday, J. S.; Rubin, L. P. (2001): Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91 (2), S. 589–595.
- Sanchez-Esteban, Juan; Wang, Yulian; Cicchiello, Lawrence A.; Rubin, Lewis P. (2002): Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 282 (3), S. L448-56. DOI: 10.1152/ajplung.00399.2000.
- Savard, Martin; Labonte, Julie; Dubuc, Celena; Neugebauer, Witold; D'Orleans-Juste, Pedro; Gobeil, Fernand, JR (2013): Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. In: *Biological chemistry* 394 (3), S. 353–360. DOI: 10.1515/hsz-2012-0295.
- Scavo, L. M.; Ertsey, R.; Chapin, C. J.; Allen, L.; Kitterman, J. A. (1998): Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 18 (1), S. 21–31. DOI: 10.1165/ajrcmb.18.1.2744.
- Schmaier, A. H.; Kuo, A.; Lundberg, D.; Murray, S.; Cines, D. B. (1988): The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (31), S. 16327–16333.
- Schunkert, H.; Dzau, V. J.; Tang, S. S.; Hirsch, A. T.; Apstein, C. S.; Lorell, B. H. (1990): Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. In: *J Clin Invest* 86 (6), S. 1913–1920. DOI: 10.1172/JCI114924.
- Shyamsundar, Murali; McAuley, Daniel F.; Ingram, Rebecca J.; Gibson, David S.; O'Kane, Donal; McKeown, Scott T. et al. (2014): Keratinocyte growth factor promotes epithelial survival and resolution in a human model of lung injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 189 (12), S. 1520–1529. DOI: 10.1164/rccm.201310-1892OC.
- Siebeck, M.; Schorr, M.; Spannagl, E.; Lehner, M.; Fritz, H.; Cheronis, J. C.; Whalley, E. T. (1998): B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. In: *Immunopharmacology* 40 (1), S. 49–55.
- Slutsky, A.; Tremblay, L. (1998): Multiple System Organ Failure: Is Mechanical Ventilation a Contributing Factor? In: *Am J Respir Crit Care Med Vol 157. pp 1721–1725.*
- Slutsky, A. S. (2005): Ventilator-Induced Lung Injury: From Barotrauma to Biotrauma. Donald F Egan Memorial Lecture 2004. In: *Respiratory Care* (50), S. 646–659.

- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85.
- Takada, Y.; Skidgel, R. A.; Erdos, E. G. (1985): Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. In: *Biochem J* 232 (3), S. 851–858.
- Takano, M.; Sakanaka, F.; Yayama, K.; Okamoto, H. (2000): Tissue-Specific expression of rat kininogen mRNAs. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 23 (10), S. 1239–1242.
- Tanaka, Akihiko; Jin, Yang; Lee, Seon-Jin; Zhang, Meng; Kim, Hong Pyo; Stolz, Donna B. et al. (2012): Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46 (4), S. 507–514. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0415OC.
- The ARDS Network (2000): Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* (342), S. 1301–1308.
- Tremblay, L. N.; Slutsky, A. S. (1998): Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. In: *Proc Assoc Am Physicians* 110 (6), S. 482–488.
- Truwit, Jonathon D.; Bernard, Gordon R.; Steingrub, Jay; Matthay, Michael A.; Liu, Kathleen D.; Albertson, Timothy E. et al. (2014): Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* 370 (23), S. 2191–2200. DOI: 10.1056/NEJMoa1401520.
- Tschumperlin, D. J.; Margulies, S. S. (1999): Alveolar epithelial surface area-volume relationship in isolated rat lungs. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 86 (6), S. 2026–2033.
- Uhlig, Stefan (2002): Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 282 (5), S. L892–6. DOI: 10.1152/ajplung.00124.2001.
- UniProt (2014): Kininogen 1 Rat. Online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/P01042>, zuletzt aktualisiert am 16.05.2014.
- Vande Geest; Di Martino; Vorp (2004): An analysis of the complete strain field within Flexercell membranes. In: *J Biomech* 37 (12), S. 1923–1928. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.02.022.
- Varano della Vergiliana, Julius; Asokanathan, Nithianathan; Stewart, Geoffrey A. (2010): Activation of the plasma kallikrein-kinin system on human lung epithelial cells. In: *Biological chemistry* 391 (9), S. 1067–1077. DOI: 10.1515/BC.2010.102.
- Villar, Jesus; Kacmarek, Robert M.; Perez-Mendez, Lina; Aguirre-Jaime, Armando (2006): A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves

outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. In: *Crit Care Med* 34 (5), S. 1311–1318. DOI: 10.1097/01.CCM.0000215598.84885.01.

Villar, Jesús; Blanco, Jesús; Añón, José Manuel; Santos-Bouza, Antonio; Blanch, Lluís; Ambrós, Alfonso et al. (2011): The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. In: *Intensive care medicine* 37 (12), S. 1932–1941. DOI: 10.1007/s00134-011-2380-4.

Vlahakis, N. E.; Schroeder, M. A.; Limper, A. H.; Hubmayr, R. D. (1999): Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. In: *The American journal of physiology* 277 (1 Pt 1), S. L167-73.

Wang, Chen Yu; Calfee, Carolyn S.; Paul, Devon W.; Janz, David R.; May, Addison K.; Zhuo, Hanjing et al. (2014): One-year mortality and predictors of death among hospital survivors of acute respiratory distress syndrome. In: *Intensive care medicine* 40 (3), S. 388–396. DOI: 10.1007/s00134-013-3186-3.

Wang, N.; Butler, J. P.; Ingber, D. E. (1993): Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. In: *Science* 260 (5111), S. 1124–1127.

Wang, Xue; Wang, Yong; Kim, Hong Pyo; Nakahira, Kiichi; Ryter, Stefan W.; Choi, Augustine M K (2007): Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (3), S. 1718–1726. DOI: 10.1074/jbc.M607610200.

Ware, L. B.; Matthay, M. A. (2000): The acute respiratory distress syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* 342 (18), S. 1334–1349. DOI: 10.1056/NEJM200005043421806.

Ware, Lorraine B. (2006): Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27 (4), S. 337–349. DOI: 10.1055/s-2006-948288.

Wei, Chih-Chang; Chen, Yuanwen; Powell, Lindsay C.; Zheng, Junying; Shi, Ke; Bradley, Wayne E. et al. (2012): Cardiac kallikrein-kinin system is upregulated in chronic volume overload and mediates an inflammatory induced collagen loss. In: *PLoS One* 7 (6), S. e40110. DOI: 10.1371/journal.pone.0040110.

Wei, Chih-Chang; Lucchesi, Pamela A.; Tallaj, Jose; Bradley, Wayne E.; Powell, Pamela C.; Dell'Italia, Louis J. (2003): Cardiac interstitial bradykinin and mast cells modulate pattern of LV remodeling in volume overload in rats. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2), S. H784-92. DOI: 10.1152/ajpheart.00793.2001.

Whitehead, T.; Slutsky, A. S. (2002): The pulmonary physician in critical care \* 7: ventilator induced lung injury. In: *Thorax* 57 (7), S. 635–642.

Wintermark, M; Wicky, S; Schnyder, P; Capasso, P (1999): Blunt traumatic pneumomediastinum: using CT to reveal the Macklin effect. In: *AJR. American journal of roentgenology* 172 (1), S. 129–130. DOI: 10.2214/ajr.172.1.9888752.

- Wirtz, H. R.; Dobbs, L. G. (1990): Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. In: *Science* 250 (4985), S. 1266–1269.
- Wirtz, Hubert R.; Dobbs, Leland G. (2000): The effects of mechanical forces on lung functions. In: *Respiration Physiology* 119 (1), S. 1–17. DOI: 10.1016/S0034-5687(99)00092-4.
- Wösten-van Asperen; Lutter; Haitsma; Merkus; van Woensel, J B; van der Loos, C M et al. (2008): ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin. In: *The European respiratory journal* 31 (2), S. 363–371. DOI: 10.1183/09031936.00060207.
- Wunderer, G.; Walter, I.; Muller, E.; Henschen, A. (1986): Human Ile-Ser-bradykinin, identical with rat T-kinin, is a major permeability factor in ovarian carcinoma ascites. In: *Biol Chem Hoppe Seyler* 367 (12), S. 1231–1234.
- Xia, Chun-Fang; Yin, Hang; Borlongan, Cesar V.; Chao, Lee; Chao, Julie (2004): Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. In: *Hypertension* 43 (2), S. 452–459. DOI: 10.1161/01.HYP.0000110905.29389.e5.
- Xie, P.; Browning, D. D.; Hay, N.; Mackman, N.; Ye, R. D. (2000): Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (32), S. 24907–24914. DOI: 10.1074/jbc.M001051200.
- Xu, Qingbo (2007): Progenitor cells in vascular repair. In: *Current opinion in lipidology* 18 (5), S. 534–539. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3282a66082.
- Xu, Xizhen; Tu, Ling; Jiang, Wei; Feng, Wenjing; Zhao, Chun Xia; Wang, Dao Wen (2012): Bradykinin prevents the apoptosis of NIT-1 cells induced by TNF-alpha via the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. In: *International journal of molecular medicine* 29 (5), S. 891–898. DOI: 10.3892/ijmm.2012.922.
- Yamada, K.; Erdos, E. G. (1982): Kallikrein and prekallikrein of the isolated basolateral membrane of rat kidney. In: *Kidney Int* 22 (4), S. 331–337.
- Yayama, K.; Hiyoshi, H.; Okamoto, H. (2001): Expressions of bradykinin B2-receptor, kallikrein and kininogen mRNAs in the heart are altered in pressure-overload cardiac hypertrophy in mice. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 24 (1), S. 34–38.
- Yayama, Katsutoshi; Matsuoka, Satoshi; Nagaoka, Makoto; Shimazu, Eri; Takano, Masaoki; Okamoto, Hiroshi (2003): Down-regulation of bradykinin B2-receptor mRNA in the heart in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. In: *Biochemical pharmacology* 65 (6), S. 1017–1025.
- Yin, Hang; Chao, Lee; Chao, Julie (2005): Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (9), S. 8022–8030. DOI: 10.1074/jbc.M407179200.

Yoshida, H.; Zhang, J. J.; Chao, L.; Chao, J. (2000): Kallikrein gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion. In: *Hypertension* 35 (1 Pt 1), S. 25–31.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	<b>Kinin-Kallikrein-System:</b> Komponenten und deren Interaktionen(Kashuba et al. 2013) .....	16
<b>Abbildung 2:</b>	<b>Schematische Darstellung der Entstehung der Kinin-Agonisten am B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptor und downstream Signalwege des B<sub>2</sub>-Rezeptors</b> (Kuhr et al. 2010). .....	20
<b>Abbildung 3:</b>	<b>Aufbau des Dehnungsapparates „Flexercell Strain Unit FX-3000“.</b> Abbildung entnommen aus der zugehörigen Beschreibung (S. 22).....	34
<b>Abbildung 4:</b>	<b>Wirkungsprinzip der Dehnung.</b> Schematischer Querschnitt durch Basisplatte mit eingesetzter BioFlex® 6-Well-Platte (links) und Foto einer BioFlex® 6-Well-Platte (rechts)34	
<b>Abbildung 5:</b>	<b>Kininogen-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> AT-II-Zellen wurden für 24 Stunden zyklischer Dehnung ausgesetzt, anschließend wurde mittels ELISA die Kininogen 1-Konzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter Zellen gemessen (Mittelwerte ± SD, Versuchsanzahl n = 7, * p < 0,05). ....	45
<b>Abbildung 6:</b>	<b>Anstieg der Kininogen-Einzelkonzentrationen in den Überständen von statischen und gedehnten AT-II-Zellkulturen.</b> (n = 7) .....	46
<b>Abbildung 7:</b>	<b>Kininogen 1-Konzentration in Zelllysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels ELISA die Kininogen 1-Konzentrationen in den Lysaten gedehnter und statischer AT-II-Zellen bestimmt und zur Gesamtproteinkonzentration in der jeweiligen Probe in Beziehung gesetzt (MW ± SD, n = 6, * p < 0,05).....	46
<b>Abbildung 8:</b>	<b>Kallikrein-Aktivität in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie die Kallikrein-Aktivität in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen gemessen (Mittelwerte ± SD, n = 7, * p < 0,05).....	47
<b>Abbildung 9:</b>	<b>Anstieg der Kallikrein-Aktivität in den Einzelproben der Überstände statischer und gedehnter AT-II-Zellen.</b> (n = 7).....	48
<b>Abbildung 10:</b>	<b>Kallikrein-Aktivität in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie die Kallikrein-Aktivität in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen gemessen (Mittelwerte ± SD, n = 9, * p < 0,05).....	48
<b>Abbildung 11:</b>	<b>Bradykinin-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> AT-II-Zellen wurden für 24 Stunden zyklischer Dehnung ausgesetzt,	

	anschließend wurde mittels ELISA die Bradykinin-Konzentration in den Überständen statischer und gedehnter Zellen gemessen (Mittelwerte $\pm$ SD, n = 6, * p < 0,05). ....	49
<b>Abbildung 12:</b>	<b>Bradykinin-Einzelkonzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellkulturen.</b> (n = 6) .....	50
<b>Abbildung 13:</b>	<b>Bradykinin-Abbau: Einzelkonzentrationen in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen.</b> Eine definierte Bradykinin-Ausgangskonzentration (2 $\mu$ mol/l) wurde für zwei Stunden in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden mittels EIA die Bradykinin-Konzentrationen in den einzelnen Proben bestimmt (n = 5).....	52
<b>Abbildung 14:</b>	<b>relativer Bradykinin-Abbau in den Überständen von statischen und gedehnten AT-II-Zellen.</b> Prozentuale Darstellung des BK-Abbaus in den Überständen in Relation zum Bradykinin-Abbau im Dehnungsmedium (Mittelwerte $\pm$ SD, n = 9, * p < 0,05). ....	52
<b>Abbildung 15:</b>	<b>Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen.</b> Nach 24 Stunden zyklischer Dehnung wurden mittels ELISA die Konzentrationen des B <sub>2</sub> -Rezeptors in den Lysaten statischer und gedehnter AT-II-Zellen bestimmt. Die Konzentrationsveränderungen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant, da p > 0,05 (Mittelwerte $\pm$ SD, n = 7). ....	53
<b>Abbildung 16:</b>	<b>Konzentration des B<sub>2</sub>-Rezeptors in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen</b> Nach zyklischer Dehnung für 24 Stunden wurden mittels EIA die Konzentrationen des B <sub>2</sub> -Rezeptors in den Überständen statischer und gedehnter AT-II-Zellen bestimmt. Die Konzentrationsveränderungen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant, da p > 0,05 (Mittelwerte $\pm$ SD, n = 5).....	54
<b>Tabelle 1:</b>	<b>Reagenzien und Chemikalien</b> .....	24
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Lösungen, Puffer und Kulturmedien</b> .....	26
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Assays</b> .....	27
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Geräte und Arbeitsmittel</b> .....	28
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Computer-Software</b> .....	30



## 9. Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> = Angiotensin-konvertierendes Enzym
AECC	<i>American-European Consensus Conference</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> = akutes Atemnotsyndrom
ALI	<i>acute lung injury</i> = akute Lungenschädigung
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BK	Bradykinin
B <sub>1</sub> -Rezeptor	Bradykinin-Rezeptor 1
B <sub>2</sub> -Rezeptor	Bradykinin-Rezeptor 2
BKR2	Bradykinin-Rezeptor 2
°C	Grad Celsius
COPD	chronic obstructive pulmonary disease = chronisch obstruktive Lungenkrankheit
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CPM	Carboxypeptidase M, membranständig
CPN	Carboxypeptidase N, plasmatisch
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EIA	Enzym-Immunoassay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
F <sub>I</sub> O <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstofffraktion

G	Gauge
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
h	hour = Stunde
HKa	Proteinrest des HMWK nach der Hydrolyse von Bradykinin
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i> = hochmolekulares Kininogen
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltriphosphat
kg	Kilogramm
KKS	Kinin-Kallikrein-System
KLP	Kallidin-like Peptide
LMWK	<i>low molecular weight kininogen</i> = niedermolekulares Kininogen
l	Liter
Lys-BK	Lys-Bradykinin = Kallidin
M	molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	mikromolar
mmol	Millimol
NEP	Neutrale Endopeptidase
NF κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	<i>nitric oxide</i> = Stickstoffmonoxid

$P_aO_2$	arterieller Sauerstoff Partialdruck
PEEP	positiver end-expiratorischer Druck
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
p-Kallikrein	Plasma-Kallikrein
PPK	Plasma-Prekallikrein
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	<i>reactive oxygen species</i> = reaktive Sauerstoffspezies
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
t-Kallikrein	<i>tissue kallikrein</i> = Gewebe-Kallikrein
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRALI	<i>transfusion-related acute lung injury</i> = akute transfusionsassoziierte Lungenschädigung
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
VALI	ventilationsassoziierte Lungenschädigung
VILI	ventilationsinduzierte Lungenschädigung
$V_T$	Tidalvolumen

## **10. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 11. Curriculum vitae

### **Persönliche Daten**

Anna Felicitas Schweinberger  
geb. am 6. April 1988  
in Erlangen

### **Schulbildung**

1993 - 1998	Katholische Grundschule Bernhard Lichtenberg, Berlin Vorklasse und 1.-4. Klasse
1998 - 2007	Jesuitengymnasium Canisius-Kolleg, Berlin Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung**

10/2007 - 04/2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
08/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011 - 03/2012	Promotionssemester
03/2013 - 02/2014	Praktisches Jahr
04/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2014 - 10/2015	Promotionsstudium

### **Promotion**

10/2011 – 12/2015	Zellexperimentelle Dissertation: „Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Kinin-Kallikrein-System in alveolären Typ-II-Zellen der Ratte.“  Leiter: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz Forschungslabor der Abteilung Pneumologie Medizinische Klinik 1, Universität Leipzig
-------------------	--

### **Beruf**

Seit 02/2016	Ärztin in Weiterbildung Allgemein- und Viszeralchirurgie Krankenhaus Weilheim i. Ob.
--------------	--

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **12. Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Hubert Wirtz für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas bedanken und die Möglichkeit, eine experimentelle Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Hartmut Kuhn, der mich bei der Durchführung und Auswertung der Experimente geduldig und engagiert betreute, und Frau Claudia Hänel, die mich sachkundig einarbeitete, für alle meine Fragen immer ein offenes Ohr hatte und die Zusammenarbeit im Labor durch ihre aufmunternde, freundliche Art außerordentlich angenehm gestaltete.

Großartige Unterstützung habe ich in jeder Phase der Doktorarbeit von meiner Familie erhalten: Ermutigung, Zuspruch und Vertrauen in meine Fähigkeit halfen über so manche Schwierigkeit hinweg. Danke an meine Geschwister, dass sie mir so zuverlässig den Rücken stärken und immer für mich da sind. Besonders meiner Mutter möchte ich dafür danken, dass sie mir während des Schreibens so verständnisvoll und motivierend zur Seite stand. Nicht zuletzt die großzügige finanzielle Zuwendung durch meine Eltern ermöglichte mir die Fertigstellung der Arbeit. Vielen Dank für alles!

Meine besondere Dankbarkeit gilt außerdem Leonhard Tappeiner und Heidi Drexler, die mir die dringend benötigten Auszeiten in meinem Refugium ermöglichten und mir dadurch neuen Mut und positive Energie spendeten.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden, die mir stets geduldige Zuhörer sind und deren ehrliche Kritik ich sehr zu schätzen weiß.